

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Universität zu Homburg/Saar

**Klinik für Innere Medizin III - Kardiologie, Angiologie und internistische  
Intensivmedizin**

**Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Michael Böhm**

# **Differentielle Phosphorylierung des Calretikulin beeinflusst die Stabilität der AT1-Rezeptor mRNA**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde

Der Medizinischen Fakultät

Der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2008

vorgelegt von

Stefan Michael Holz

geb. am 26.02.1981 in Bad Tölz

Dekanin/Dekan:      Universitätsprofessor Dr.

1. Berichterstatterin/Berichterstatter:

2. Berichterstatterin/Berichterstatter:

**Erklärung:**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts habe ich keine Unterstützungsleistungen erhalten.

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und ist auch noch nicht veröffentlicht.

Tübingen, den 21.11.2008

Stefan Michael Holz

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von März 2004 - September 2008 in der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. med. Georg Nickenig in der Klinik III für Innere Medizin der Universität zu Homburg/Saar (Direktor Professor Dr. med. Michael Böhm) und der Universität zu Bonn (Direktor Professor Dr. med. Georg Nickenig) unter Betreuung von Frau Dr. rer. nat. Anja Berger und Herrn Dr. med. Cornelius Müller angefertigt.

## **Danksagung**

Meinem akademischen Leiter, Herrn Professor Dr. med. Georg Nickenig, danke ich besonders herzlich. Er überließ mir das Thema und begleitete mit seinem wissenschaftlichen Rat und Ansporn die Umsetzung des Projekts mit großem Engagement.

Ebenso danke ich Herrn Professor Dr. med. Michael Böhm und Herrn Professor Dr. med. Georg Nickenig, dass sie mir gestatteten, in den Laborräumen der Klinik III für Innere Medizin der Universität zu Homburg/Saar diese Arbeit anzufertigen.

Frau Dr. rer. nat. Anja Berger bin ich zu besonderem Dank verpflichtet. Ihr persönliches Engagement und ihre gewissenhafte sowie anspornende Betreuung waren stets eine große Hilfe und Unterstützung.

Im selben Maße gilt mein Dank Herrn Dr. med. Cornelius Müller für die Übernahme der Betreuung nach dem Ausscheiden von Frau Dr. rer. nat. Anja Berger.

Mein herzlicher Dank gilt schließlich all denen, die durch Ihre Gesprächsbereitschaft zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Zu nennen sind hier im Besonderen meine Eltern Josefa und Werner Holz sowie mein Bruder Erster Bürgermeister/ Rechtsanwalt Dipl. Jur. Univ. Thomas W. Holz, welche die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens zuverlässig und zügig übernommen haben.

**Meinen Eltern in Dankbarkeit**

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>2</b>
2.1 Das Renin-Angiotensin-System	2
2.2 Die Angiotensin II Rezeptoren	4
2.3 Der Angiotensin II-(Typ 1)-Rezeptor	4
2.3.1 Struktur des Angiotensin II-(Typ 1)-Rezeptors	4
2.3.2 Signaltransduktion des Angiotensin II-(Typ 1)-Rezeptors	5
2.3.3 Regulation des Angiotensin II-(Typ 1)-Rezeptors	6
2.3.4 Destabilisierung der AT1-Rezeptor mRNA	7
2.3.5 Bindungsproteine an der 3'-UTR der AT1-Rezeptor mRNA	8
2.4 Calretikulin	9
2.5 Kinasen und Phosphatasen	12
2.6 Ziele dieser Arbeit	14
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>15</b>
3.1 Material	15
3.1.1 Verwendete Materialien	15
3.1.2 Geräte	19
3.1.3 Lösungen und Puffer	20
3.1.4 Primer	24
3.2 Methoden	25
3.2.1 Zellkultur	25
3.2.1.1 Glatte Gefäßmuskelzellen	25
3.2.1.2 Kultivierung	25
3.2.1.3 Stimulation mit Hemmstoffen	26
3.2.1.4 Transfektion	27
3.2.1.5 Isolation von Gesamt RNA	28
3.2.1.6 Immunpräzipitation aus transfizierten Zellen	28

	<b>Seite</b>
3.2.1.7 Immunpräzipitation aus nicht transfizierten Zellen	<b>29</b>
3.2.2 Herstellung von DNA-Konstrukten	<b>29</b>
3.2.2.1 DNA-Gewinnung durch Transformation und Minipräparation	<b>29</b>
3.2.2.2 Plasmid-Isolation mittels Largepräparation	<b>30</b>
3.2.2.3 Kontrolle der Plasmid DNA durch Restriktionsverdau	<b>31</b>
3.2.2.4 Klonierung von DNA-Fragmenten in Vektoren	<b>32</b>
3.2.2.5 Gelelution	<b>33</b>
3.2.2.6 Glyzerolstocks	<b>33</b>
3.2.3 Experimente zur RNA Stabilität	<b>33</b>
3.2.3.1 Northern-Blot Experimente und Herstellung radioaktiv markierter cDNA-Sonden	<b>33</b>
3.2.3.2 Reverse Transkription	<b>34</b>
3.2.3.3 Q-PCR	<b>35</b>
<b>3.3 Auswertung</b>	<b>35</b>
 <b>4. Ergebnisse</b>	 <b>36</b>
<b>4.1 Ziel der Arbeit</b>	<b>36</b>
<b>4.2 Hemmung von Kinasen und Phosphatasen und deren Wirkung auf die AT1-Rezeptor mRNA</b>	<b>36</b>
4.2.1 Der Serin-Phosphatase-Hemmstoff Cantharidin	<b>37</b>
4.2.2 Der Serin-Phosphatase-Hemmstoff Okadiac Acid	<b>40</b>
4.2.3 Der Tyrosin-Kinase-Inhibitor Tyrphostin	<b>42</b>
4.2.4 Der Tyrosin-Phosphatase-Inhibitor Orthovanadat	<b>46</b>
<b>4.3 Q-PCR</b>	<b>48</b>
4.3.1 Die Tyrosin-Kinase SRC	<b>48</b>
<b>4.4 Immunpräzipitation aus transfizierten VSMC</b>	<b>49</b>

	<b>Seite</b>
<b>5. Diskussion</b>	<b>51</b>
5.1 Bedeutung von Calretikulin für die Destabilisierung der AT1-Rezeptor mRNA	51
5.2 Die Rolle der Phosphatasen für den Mechanismus des AT1-Rezeptor mRNA Abbau durch Calretikulin	52
5.3 Die Rolle der Kinasen für den Mechanismus des AT1-Rezeptor mRNA Abbau durch Calretikulin	53
5.4 Klinische Bedeutung	54
5.5 Ausblick	54
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>56</b>
<b>7. Lebenslauf</b>	<b>64</b>



## **Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen**

Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-Convertin-Enzym
AngII	Angiotensin II
AT 1- Rezeptor/ AT1-R.	Angiotensin II-Rezeptor Typ I
AT 2- Rezeptor	Angiotensin II-Rezeptor Typ II
B	Basen
Bp	basepairs ( <i>Basenpaare</i> )
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
DAG	Diacylglycerol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbeccoo`s modifiziertes Eagle Medium
EGFR	epidermal growth factor receptor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
g	Gramm
H	Stunde
IP3	Inositol-1, 4, 5-Triphosphat
Kb	Kilobase
kDA	Kilo-Dalton
KHK	Koronare Herzerkrankung
kV	Kilovolt
MAPK	mitogen-activated-protein kinase
mg	Milligramm
ml	Milliliter
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium

nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCIA	Phenol-Chloroform-Isoamyl-Alkohol
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDGF	Platelet derived growth factor
PLC	Phospholipase C
RAS	Renin-Angiotensin-System
rpm	rotations per minute
RT	Reverse Transkriktion
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
sek	Sekunden
STABWN	Standardabweichung
STAT	Signal Transducers and Aktivators of Transcription (Signaltransduktoren und Transkriptionsaktivatoren)
Std	Stunden
U	Einheit der Enzymaktivität
Upm, U/min	Umdrehungen pro Minute
3' UTR	3' untranslatierte Region
V	Volt
VSMC	vascular smooth muscle cell
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

# **1. Zusammenfassung**

Der AT1-Rezeptor spielt in der Pathogenese der Hypertonie und Atherosklerose eine bedeutende Rolle. Die Regulation des AT1-Rezeptors erfolgt posttranskriptionell durch Stabilisierung oder Destabilisierung der AT1-Rezeptor mRNA. Hieran sind mRNA-Bindungsproteine beteiligt. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass phosphoryliertes Calretikulin ein für die Stabilität des AT1-Rezeptors entscheidendes Bindungsprotein ist und an die AT1-Rezeptor mRNA bindet. Phosphoryliertes Calretikulin destabilisiert die AT1-Rezeptor mRNA und führt hierüber zu einer Herabregulation des AT1-Rezeptors. Bislang war unklar, welche Bereiche der Proteinsequenz des Calretikulins vor einer Bindung phosphoryliert werden, und welche Kinasen oder Phosphatasen entscheidend an der Phosphorylierung des Calretikulins beteiligt sind.

Glatte Gefäßmuskelzellen (VSMC) wurden mittels Angiotensin II ( $10^{-6}$ ) stimuliert und die Phosphorylierung des Calretikulin-Tyrosinrestes 285 sowie der Serinreste 69, 190 und 213 im Zeitverlauf gemessen. Dabei zeigte sich eine signifikante Zunahme der Tyrosinphosphorylierung und überraschenderweise eine Abnahme der Serinphosphorylierung der Calretikulinstruktur. Daher wird im Folgenden die Bedeutung der Tyrosinphosphorylierung sowie der Serindephosphorylierung des Calretikulins für die Stabilität der AT1-Rezeptor mRNA mittels pharmakologischer Inhibitoren untersucht. Sowohl eine pharmakologische Inhibition der Serindephosphorylierung als auch eine pharmakologische Inhibition der Tyrosinphosphorylierung bewirkten eine Stabilisierung der AT1-Rezeptor mRNA. Somit wurde nachgewiesen, dass beide Mechanismen zur Regulation des AT1-Rezeptors beitragen. Darüberhinaus wurde untersucht, welche Kinasen bzw. Phosphatasen die Phosphorylierung des Calretikulins bewirken. Mittels Crosslinkassay sowie durch Transfektionsexperimente konnte die SRC-Kinase als entscheidendes Enzym der Calretikulinphosphorylierung identifiziert werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse bieten neue Ansatzpunkte zum Verständnis der physiologischen Mechanismen der AT1-Rezeptorregulation und der Pathomechanismen, die an der Entstehung vaskulärer Erkrankungen beteiligt sind.

## **2. Einleitung**

### **2.1 Das Renin-Angiotensin-System**

Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems sind in den letzten Jahrzehnten zu den Zivilisationskrankheiten schlechthin geworden. Die Erforschung des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) ist daher von besonderer Wichtigkeit, um die Folgen der Erkrankungen besser behandeln und eine Prävention effektiver gestalten zu können. Das Renin-Angiotensin-System (RAS) beeinflusst wesentlich die Blutdruck-, Wasser- und Elektrolythomeostase des Organismus (*Griendling et al., 1993*). Fast alle biologischen Effekte, die von diesem System ausgehen, werden durch Angiotensin II Typ 1- und Typ 2-Rezeptoren nach Bindung des Oktapeptids Angiotensin II vermittelt (*Griendling et al., 1993; Hoffmann et al., 2001*). Hierzu zählen Hypertrophie glatter Gefäßmuskelzellen, myokardiale Hypertrophie, Blutdruckerhöhung und Vaskonstriktion. Ebenso kommt es zur Sympathikusaktivierung mit Katecholaminfreisetzung und Erhöhung der Aldosteronausschüttung verbunden mit einem Anstieg der renalen Natrium- und Flüssigkeitsretention. Angiotensin II (*AngII*), das effektvermittelnde Hormon des RAS, wird über verschiedene Vorstufen gebildet. Zu Beginn der enzymatischen Kaskade steht das Angiotensinogen, ein 55-65 kDa schweres alpha 2-Globulin, welches in der Leber gebildet und von dort ins Serum sezerniert wird (*Griendling et al., 1993*).

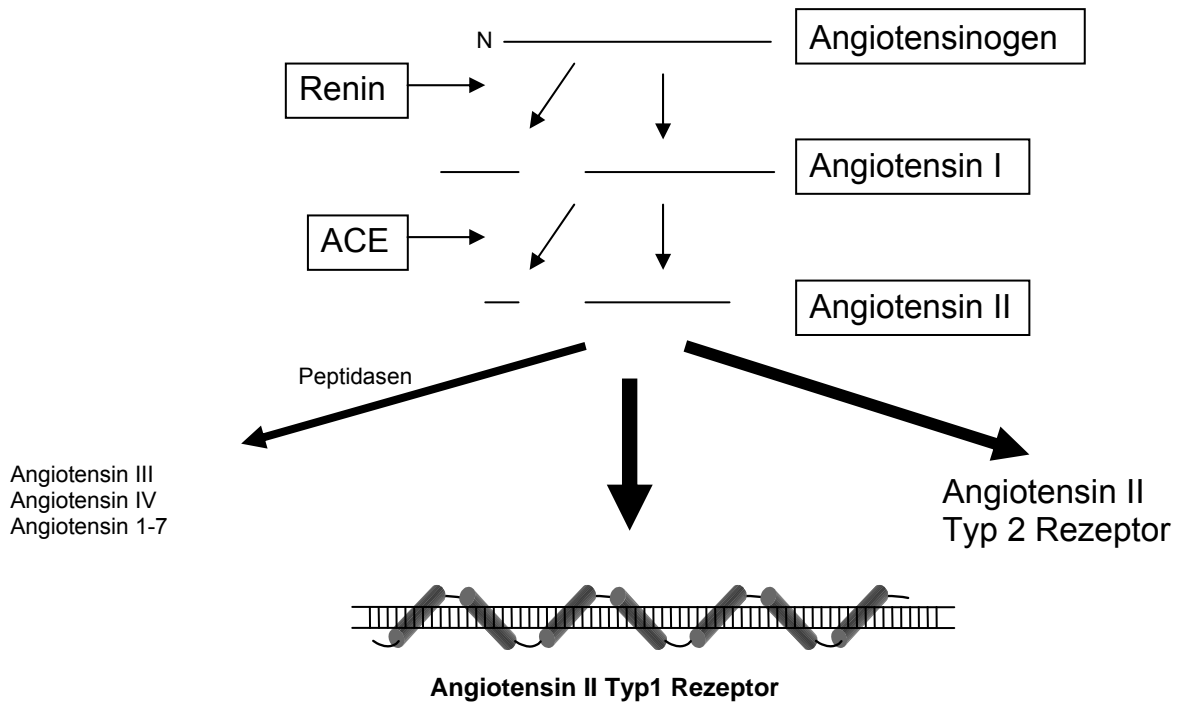


Abbildung 2.1: Das Renin-Angiotensin-System.

Schematische Darstellung der Entstehung von Angiotensin II. Diese zeigt die Umwandlung von Angiotensinogen zum Angiotensin II durch Abspaltung von Peptiden. Beim Abbau von Angiotensin II entstehen Metaboliten, die zum Teil ebenfalls gefäßaktiv wirksam sind (Angiotensin III, IV, 1-7). Möglicherweise gibt es neben den AT1- und AT2-Rezeptoren noch weitere Angiotensin-Rezeptoren, die als Bindungsstellen der Angiotensinmetaboliten dienen. (ACE: *angiotensine converting enzyme*).

Renin, ein proteinspaltendes Enzym des juxtaglomerulären Apparates der Niere, spaltet ein 10 Aminosäuren langes Peptid vom N-Terminus des Angiotensinogens ab und es entsteht Angiotensin I, eine Vorstufe des Angiotensin II. Durch das so genannte Angiotensin-Converting-Enzym, eine in Lunge und in anderen Geweben vorkommende Zink-Metallopeptidase, wird durch Abspaltung eines Dipeptids vom Carboxy-Terminus des Angiotensin I schließlich das hochaktive Oktapeptid Angiotensin II gebildet (Griendling et al., 1993) (Abbildung 2.1).

Die Stimulation des AT1-Rezeptors durch Angiotensin II führt letztlich zur Blutdruckerhöhung und zur Wasser- und Natriumretention (Nicknig et al., 2002). Das kurzlebige Angiotensin II wird durch weitere zirkulierende und gewebeständige Peptidasen zu aktiven und inaktiven Fragmenten abgebaut (Griendling et al., 1993).

## **2.2 Die Angiotensin II-Rezeptoren**

Der menschliche Körper besitzt verschiedene Rezeptoren für Angiotensin II (*Gunther, 1984*). Es existieren mindestens zwei Angiotensinrezeptoren, der AT1- und der AT2-Rezeptor (*Timmermans et al., 1993; Inagami et al., 1994*). Beide werden in verschiedenen Zellpopulationen unterschiedlich stark ausgeprägt. So wird der AT2-Subtyp vornehmlich in fetalem Gewebe exprimiert (*Capponi et al., 1996*), weswegen man ihm Funktionen wie Steuerung der Zelldifferenzierung, Inhibition des Zellwachstums, Apoptose und Zellregeneration zuschreibt (*Nakajima et al., 1995; Stoll et al., 1995; Yamada et al., 1996*). Hingegen lässt sich der AT1-Rezeptor in den verschiedensten Geweben nachweisen. Dieser wird vorwiegend in der Gefäßmedia, in der Leber, der Niere, der Nebenniere, dem Gehirn und dem Herzen ausgebildet (*Murphy et al., 1992; Griendling et al., 1993; Timmermans et al., 1993*). In glatten Gefäßmuskelzellen, einem Schlüsselgewebe in der Pathogenese der arteriellen Hypertonie, kommt es ausschließlich zur Expression des AT1-Subtyps (*Liu et al., 1995*). Die meisten biologischen Wirkungen des Angiotensin II werden über den AT1-, nur ein kleiner Teil über den AT2-Rezeptor vermittelt (*Timmermans et al., 1993*).

## **2.3 Der Angiotensin II-(Typ1)-Rezeptor**

### **2.3.1 Struktur des Angiotensin II-(Typ1)-Rezeptors**

Die Klonierung und Sequenzierung des AT1-Rezeptors zeigte, dass es sich hierbei um einen so genannten G-Protein gekoppelten Rezeptor handelt (*Murphy et al., 1991*). Der AT1-Rezeptor besteht aus insgesamt 359 Aminosäuren mit einer molaren Masse von 41 kDa, und ist durch sieben Transmembrandomänen gekennzeichnet, welche für die Verankerung in der Zellmembran und für die intrazelluläre Signaltransduktion von besonderer Bedeutung sind (*Murphy et al. 1992*). Die genomische Struktur des AT1-Rezeptors ist in verschiedenen Spezies unterschiedlich. In der Ratte wurden die mRNA für zwei AT1-Subtypen, AT1a und AT1b isoliert (*Inagami et al., 1993*). In diesem Tiermodell besteht das AT1a-Gen aus mehr als 80 Kb und aus vier Exons, wobei das dritte Exon die gesamte codierende Rezeptorregion enthält

(*Griendling et al., 1993*). Der humane AT1-Rezeptor reicht dagegen über mindestens 60 Kb. Das kodierende Gen befindet sich auf Chromosom 3 und bildet die Matrix einer 47 Kb pre-mRNA, welche 5 Exons enthält. Hier besitzt das letzte die Rezeptor-Sequenz. Durch unterschiedliches Splicing entstehen zwei Isoformen, AT1 und AT2, welche in verschiedenen Geweben exprimiert werden.

Die Sequenz des AT2-Subtyps ist auf dem X-Chromosom gespeichert. Sie enthält insgesamt 363 Aminosäuren, ist zu 30 Prozent der AT1-Rezeptor Sequenz homolog und wurde erstmals 1993 entschlüsselt (*Timmermans et al., 1993*).

### **2.3.2 Signaltransduktion des Angiotensin II-(Typ1)-Rezeptors**

Die bekannteste und wohl wichtigste AT1-Rezeptor vermittelte Wirkung ist die Kontraktion glatter Gefäßmuskelzellen. Dies führt folglich zur Vasokonstriktion mit Anstieg des Blutdruckes. Der AT1-Rezeptor bewirkt außerdem die Mobilisierung von intrazellulärem Calcium, die Stimulation der Proteinsynthese in glatten Muskelzellen, die Aldosteronfreisetzung sowie die Inhibition der Adenylatcyclase in der Leber (*Griendling et al., 1994 a*). Verantwortlich für diese physiologischen Effekte ist die Aktivierung des AT1-Rezeptors durch seinen Liganden Angiotensin II und die damit verbundene Initialisierung der intrazellulären Signaltransduktion (*Griendling et al., 1994 a*). Obwohl es sich bei dem AT1-Rezeptor um einen G-Protein gekoppelten Rezeptor handelt (*Luchtefeld et al., 2001; Nakashima et al., 2006; Mitchell et al., 2006*), konnte dennoch eine G-Protein unabhängige Signalweiterleitung nachgewiesen werden. Diese äußert sich hauptsächlich am kardialen Gewebe mit ventrikulärer Dilatation und muskulärer Hypertrophie sowie mit myokardialer Apoptose (*Zhai et al., 2005; Rajagopal et al., 2005*). Ein wichtiger Mechanismus ist hierbei der *JAK/STAT Pathway*.

Die G-Protein gekoppelte Aktivierung des AT1-Rezeptors durch Angiotensin II wird über verschiedene Signaltransduktionswege innerhalb der Zelle weitergeleitet. Durch Stimulierung der Phospholipase C wird Phosphatidylinositol zu Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP<sub>3</sub>) hydrolysiert. Letzteres ist für die Leerung der intrazellulären Calciumspeicher verantwortlich (*Luchtefeld et al., 2001*). DAG hingegen aktiviert die Proteinkinase C (*Griendling et al., 1993*). Über die Phospholipase A<sub>2</sub> werden bei Aktivierung des AT1-Rezeptors in glatten Gefäßmuskelzellen und im

proximalen Tubulus der Niere Prostaglandine freigesetzt (*Murphy et al., 1992*). Die Stimulation von Phospholipase D führt zur Spaltung von Phosphatidylcholin in Cholin und Phosphatidylsäure, welches auch in DAG umgewandelt wird und es so zu einer erneuten Aktivierung der Proteinkinase C kommt. (*Griendling et al., 1993*). Es gibt Hinweise, dass die Freisetzung von cAMP, nach Aktivierung der Adenylatcyclase, an der Regulation des AT1-Rezeptors beteiligt ist (*Murphy et al., 1992*). Die Stimulierung des AT1-Rezeptors durch Angiotensin II resultiert in glatten Gefäßmuskelzellen durch Stimulation der NADH- und NADPH-Oxidasen in der Freisetzung freier Sauerstoffradikale (*Griendling et al., 1994 b*). Zudem werden nach Bindung von Angiotensin II an den AT1-Rezeptor in den glatten Gefäßmuskelzellen verschiedenste Kinasen und Phosphatasen aktiviert.

### **2.3.3 Regulation des Angiotensin II-(Typ1)-Rezeptors**

Bei der Regulation unterscheidet man vier Mechanismen (*Nickenig, Harrison 2002a*):

- 1) Das Rezeptor-Protein kann nach Bindung von Angiotensin II an den AT1-Rezeptor internalisiert werden. Folglich reduziert sich die Rezeptor Anzahl an der Zelloberfläche (*Kai et al., 1994*).
- 2) Zur Desensibilisierung des AT1-Rezeptors kommt es durch Stimulation mit AngII über die Proteinkinase C.
- 3) Die Translation des AT1-Rezeptor-Proteins kann durch alternatives *Splicing* der AT1-Rezeptor pre-mRNA reguliert werden (*Curnow 1996*).
- 4) Posttranskriptionell wird über eine Verminderung der Stabilität der AT1-Rezeptor mRNA nach Stimulation mit AngII eine Herabregulation des AT1-Rezeptors erreicht (*Lassegue et al., 1995; Nickenig 1994*).

Die biologische Antwort des Organismus auf das Angiotensin II ist abhängig von der Rezeptordichte des AT1-Rezeptors auf der Zelloberfläche, welche sich sehr variabel gestalten kann (*Nickenig und Murphy, 1994*). Hieraus ergibt sich, dass die gleiche Menge Angiotensin II je nach Rezeptordichte zu unterschiedlich starker Vaskonstriktion führt. Der entscheidende Regulationsmechanismus ist die unter Punkt 4 aufgeführte posttranskriptionelle Regulation. Die Herab- oder Hochregulation des AT1-Rezeptors ist ein länger andauernder Prozess, der durch die verstärkte bzw.



verminderte Bildung an AT1-Rezeptor mRNA zustande kommt. Dies hat eine vermehrte oder abgeschwächte Produktion an Rezeptor-Protein zur Folge (*Lassegue et al., 1995; Nickenig et al., 1997a*). Intrazellulär liegt dem eine Modulation der Halbwertszeit der AT1-Rezeptor mRNA zugrunde, weniger eine Veränderung der Gentranskription (*Nickenig und Murphy, 1994*). Verschiedene Stadien regulative Mechanismen müssen auf dem Weg von der DNA zum Protein durchlaufen werden. Unterschieden werden transkriptionelle, posttranskriptionelle, translationelle und posttranslationelle Kontrolle (*Darnell 1982*). Die posttranskriptionelle Regulation umfasst die Kontrolle des RNA-Processing, bei dem das primäre RNA-Transkript durch Spleißen oder andere Mechanismen verändert wird (*Jones 1989; Green 1991; Black 1992*). Auch die Kontrolle des RNA-Transports aus dem Kern (*Maquat 1991*) und die Destabilisierung der mRNA im Zytoplasma (*Sachs 1990*) ist dabei enthalten. Der AT1-Rezeptor wird posttranskriptionell über die Stabilität seiner mRNA reguliert (*Nickenig and Murphy, 1994; Nickenig et al., 2001*).

#### **2.3.4 Destabilisierung der AT1-Rezeptor mRNA**

Die bereits erwähnte langfristige Herabregulation des AT1-Rezeptors durch Angiotensin II erfolgt zunächst über eine verminderte Transkription der AT1-Rezeptor mRNA (*Lassegue et al., 1995*). Zusätzlich wird der Rezeptor noch durch Destabilisierung seiner mRNA im Zytoplasma reguliert (*Lassegue et al., 1995*). Die Halbwertszeit der AT1-Rezeptor mRNA im Zytoplasma beträgt etwa 6 Stunden. Dies wurde durch Experimente ermittelt, in denen die Transkription durch Actinomycin D geblockt und der AT1-Rezeptor mRNA-Spiegel über mehrere Stunden gemessen wurde (*Nickenig and Murphy, 1994*). Mittels dieser Untersuchungen ließ sich feststellen, dass auch im Falle eines totalen Transkriptionsstops nach 6 Stunden noch die Hälfte der AT1-Rezeptor mRNA im Zytoplasma vorliegt. Bei vorhergehender Stimulation mit Angiotensin II reduziert sich die Halbwertszeit der AT1-Rezeptor mRNA jedoch auf 2 Stunden. Daraus lässt sich folgern, dass eine posttranskriptionelle Destabilisierung der AT1-Rezeptor mRNA einen entscheidenden Mechanismus der Herabregulation durch Angiotensin II darstellt.

### 2.3.5 Bindungsproteine an 3'-UTR der AT1-Rezeptor mRNA

Proteine, welche innerhalb der 3'-UTR von RNA's binden und verschiedene Funktionen im RNA-Abbauprozess übernehmen können, sind an diesem Prozess beteiligt (*Chen and Shyu, 1995; Burd and Dreyfuss, 1994*). Aktivität sowie Expression der Proteine korreliert mit der Abbaurate der entsprechenden RNA's (*Malter and Hong, 1991*). Viele der mRNA-Bindungsproteine besitzen eine niedrige Sequenzspezifität und übernehmen eher generelle Funktionen beim RNA-Transport, der RNA-Reifung oder der Stabilisierung von mRNA's (*McCarthy and Kollmus, 1995*). Eine kleinere Gruppe von Proteinen zeichnet sich durch eine hohe Sequenzspezifität aus, weshalb sie nur an bestimmte mRNA's binden können. Ein vermehrter Abbau oder eine erhöhte Stabilität der jeweiligen mRNA kann die Folge sein. Ein Beispiel hierfür bieten die beiden Proteine p45 und p75, welche innerhalb derselben Region der 3'-UTR von Ribonukleotidreduktase 2 (RR2) mRNA binden, dort aber genau gegensätzliche Effekte vermitteln. Weitere mRNA-Bindungsproteine sind für die Protoonkogene *c-fos* und *c-myc*, das Lymphokin GM-CSF und den  $\beta$ -adrenergen Rezeptor beschrieben worden (*Bohjanen et al., 1991; Vakalopoulou et al., 1991; Port et al., 1992; You et al., 1992*). Im Bereich der *AU-rich elements* (AREs) am 3'-untranslatierten Ende der AT1-Rezeptor mRNA befindet sich eine Kopie des AUUUA-Pentamers. Viele Bindungsproteine benötigen zur Bindung eine solche Sequenz. mRNAs, die AREs besitzen, neigen zur Instabilität (*Peng et al., 1998*). Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass so genannte „stem loops“ über eine Deadenylierung des Poly A-Endes der 3'-UTR zu einer Destabilisierung der mRNA führen (*Brown et al., 1996; Putland et al., 2002; Berger et al., 2005*). *Nickenig* und *Murphy* zeigten 1996 die Induktion eines Komplexes von polysomalen Proteinen nach Stimulation der VSMC mit AngII, welche an die 3'-UTR der AT1-Rezeptor mRNA spezifisch binden. Es konnte der Bereich auf die Nukleotide 1864 bis 2213 eingegrenzt werden (*Nickenig and Murphy 1996*). In dieser 349 Basen lange Sequenz wurde ein erhöhter Anteil an Uridin- und Adenosinresten festgestellt, jedoch ließ sich ein AUUUA-Pentamer nicht nachweisen (*Murphy et al. 1991*). *You et al.* konnte 1992 zeigen, dass dieses Pentamer nicht notwendigerweise für die Bindung von Proteinen vorhanden sein muss. Im Bereich zwischen den Basen 2175 und 2195 binden verschiedene Proteine an der AT1-Rezeptor mRNA, welche wiederum die Stabilität beeinflussen (*Nickenig et al., 2001; Berger et al., 2005*). Calretikulin konnte bereits als

eines dieser Bindungsproteine identifiziert werden (*Nickenig et al., 2002b*). Durch eine Zellstimulierung glatter Gefäßmuskeln mit Angiotensin II wird Calretikulin im Bereich eines Tyrosinrestes phosphoryliert. Dies ermöglicht die Bindung an die Basensequenz 2175 bis 2195 der AT1-Rezeptor mRNA und resultiert in einer Destabilisierung der mRNA (*Berger et al., 2005*). Ebenfalls wird das Calretikulin nach Hinzugabe von Angiotensin II im Bereich eines Serinrestes dephosphoryliert, jedoch konnte bisher kein Zusammenhang mit der Destabilisierung der AT1-Rezeptor mRNA nachgewiesen werden.

## **2.4 Calretikulin**

Die Aktivierung des Calretikulins hat eine Destabilisierung der AT1-Rezeptor mRNA glatter Gefäßmuskelzellen zur Folge (*Nickenig et al., 2002*). Das menschliche Calretikulin ist ein 46 kDa schweres einzelsträngiges Polypeptid (*Michalak et al., 1999*) bestehend aus 400 Aminosäuren (*Højrup et al., 2001*). Dieses Protein wurde erstmals 1974 von *Ostwald* und *MacLennan* im Sakroplasmatischen Retikulum von Rattenmuskeln entdeckt und bekam den Namen „HACBP“ für *High Affinity Calcium Binding Protein* (*Michalak et al., 1999*). Im Jahre 1992 wurde das menschliche Calretikulin erstmalig isoliert. Es konnte gezeigt werden, dass sich sowohl das Mausgen als auch das menschliche Gen auf Chromosom 19 bzw. 8 befindet (*McCauliffe et al., 1992*). Die Nukleotidsequenz zwischen menschlichem Calretikulin und dem der Maus weisen eine über 70-prozentige Übereinstimmung auf (*Waser et al., 1997*). Die Lokalisation des humanen Calretikulins wurde für mehrere Kompartimente in der Zelle beschrieben, wie z.B. im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) (*Johnson et al., 2001*) und im Nukleus (*Opas et al., 1991*). Calretikulin konnte im Zytoplasma von *Wheeler (et al., 1995)* in der Nähe der Zellmembran und des Zellkerns sowie von *Holaska (et al., 2001)* generell im Zytoplasma nachgewiesen werden. Ein Vorkommen auf der Zelloberfläche, wo es Bindungen mit verschiedenen Rezeptoren eingeht, ließ sich ebenfalls beobachten (*Wayne et al., 2002; Gray et al., 1995; Seddiki et al., 2001*). *Højrup (et al., 2001)* berichtete von einer in der humanen Plazenta vorkommenden modifizierten Form. Calretikulin ist hauptsächlich in nichtmuskulären Zellen und in glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert, während der Anteil in Herz- und Skelettmuskel eher gering ist

(*Michalak et al., 1999*). Das Protein besitzt neben seiner Wirkung als Calcium-speicherndes Protein noch weit mehr Aufgaben. Hierzu zählen Funktionen im bzw. am Endoplasmatischen Retikulum (ER) wie Faltung und Oligomerisation von Glykoproteinen (*Vassiliakos et al., 1998*) sowie die Protektion von nicht-glykosylierten Proteinen vor thermischer Denaturierung (*Saito et al., 1999*). Calretikulin moduliert außerhalb des ER die steroidsensitive Genexpression (*Burns et al., 1994; Dedhar, 1994*), spielt eine Rolle in der Zelladhäsion (*Fadel et al., 1999; Coppolino et al., 1995*) sowie der Instandhaltung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Homeostase (*Groenendyk et al., 2005*) und hat darüber hinaus noch weitere Aufgaben in der Zelle. Man unterteilt das Calretikulin aufgrund seiner unterschiedlichen Funktionen in die N-, P- und C-Domäne. Aminosäure (AS) 1-179 gehören der N-, AS 180-279 zur P- und AS 280-400 zur C-Domäne (*Nash et al., 1994*) an. Die N-Domäne beginnt mit einer „Leader Sequenz“, welche für den Transport des Calretikulins ins Lumen des ER zuständig ist. Dieser 179 Aminosäuren umfassende Anteil ist sehr gut konserviert und besteht bei Mensch und Maus aus 4 Exons (*Michalak et al., 1999*). Zudem befinden sich in jener Aminosäuresequenz sechs mögliche Phosphorylierungsstellen für PKC, die mRNA Bindestelle für den Rubella Virus (*Atreya et al., 1995*) sowie eine Kontaktfläche für einen Steroidhormon-Rezeptor. Es liegt hier der Bereich des Calretikulins, welcher mit dem DNA-bindenden Teil unterschiedlicher Rezeptoren, wie dem Glukokortikoid- und Androgen-Rezeptor, interagiert (*DeFranco, 2001; Black et al., 2001*). Die N-Domäne ist zudem für die hemmende Aktivität des Calretikulins bei der Angiogenese und der Tumorsuppression verantwortlich (*Michalak et al., 1999*). An diesem Anteil des Calretikulins bindet Zink (*Baksh et al., 1995*). In der prolinreichen P-Domäne kann Calcium zwar mit hoher Affinität, jedoch nur mit niedriger Kapazität gebunden werden. Dies hat keinen Einfluß auf die Calcium-Speicherung des ER (*Nakamura et al., 2001*). Aufgrund seiner *lectin like chaperon side* liefert die P- neben der N-Domäne einen essentiellen Beitrag der Proteinfaltungskontrolle (*Michalak et al., 1999*). Es ist bekannt, dass die Bindung von Zink an Calretikulin zu dessen Konformationsänderung führt und daraus eine veränderte Chaperonfunktion resultiert (*Guo et al., 2003; Saito et al., 1999*). Die höchste Kapazität zur Calcium-Bindung besitzt ohne Zweifel die C-Domäne mit ihrer endständigen COOH-Gruppe. Diese ist reich an sauren Aminosäuren und kann an ER Proteine, Faktor IX, Faktor X und an der Zelloberfläche binden (*Michalak et al., 1999*). Zudem wird Calretikulin aufgrund seiner C-Domäne antithrombotische Wirkung zugeschrieben (*Kuwabara et al., 1995*). Wird die  $\alpha$ -Helix

ausbildende C-Domäne alleine exprimiert, ist dies sehr instabil, da nur die N- und P-Domänen eine vor Proteolyse geschützte Konformation annehmen können (*Corbett et al., 2000*).

Calretikulin ist entscheidend an der Destabilisierung der AT1-Rezeptor mRNA beteiligt. Die Aktivierung des Calretikulins erfolgt über eine Tyrosin-Phosphorylierung. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe (*Nickenig et al., 2002b*) zeigten, dass es nur durch JNK und SRC Kinase eine Phosphorylierung des Calretikulins erfolgte.  $\beta$ -IR Kinase und Autophosphorylierung konnten diesen Effekt nicht vorweisen. Als Bindungsstelle des Calretikulins an der AT1-Rezeptor mRNA wurde die Sequenz zwischen den Basen 2175 und 2195 identifiziert. Calretikulin kann bei Fehlen dieser Basensequenz nicht an die AT1-Rezeptor mRNA binden. Es ist noch nicht klar, ob eine Konformationsänderung des Calretikulins oder die Aktivierung eines präformierten Bereich der Grund ist, wodurch das Calretikulin nach Phosphorylierung mit der AT1-Rezeptor mRNA interagieren kann. Weiterhin ist noch unklar, wodurch es zum Abbau der mRNA kommt. Eine direkte Aktivierung der RNasen wäre denkbar, ebenso eine durch Calretikulin bedingte Änderung in der Tertiärstruktur der mRNA mit Ausbildung von Angriffspunkten für RNasen. Eine Serin-Dephosphorylierung wurde ebenfalls nachgewiesen, jedoch konnte bisher kein Zusammenhang mit der Destabilisierung der AT1-Rezeptor mRNA gezeigt werden.

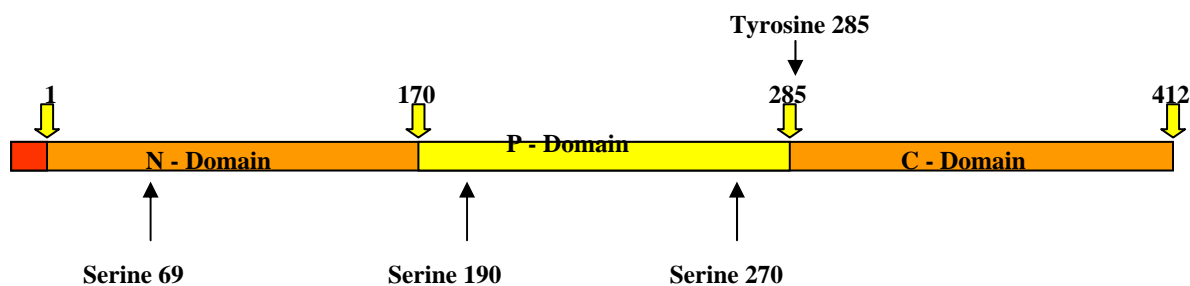
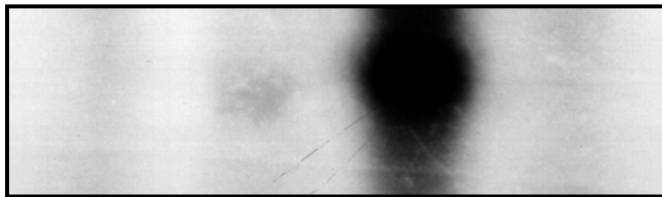


Abb.1.2: Strukturelle Darstellung der 3 Domains von Calretikulin mit den darin enthaltenen für die Phosphorylierung/Dephosphorylierung wichtigen Tyrosin- bzw. Serinreste

## 2.5 Kinasen und Phosphatasen

Tyrosin-Kinasen spielen eine Rolle bei der Kontraktion von glatter Muskulatur (*Yang et al., 1993*). Die Phosphorylierung des Calretikulins wird durch Tyrosin-Kinasen vermittelt. In Betracht kommen hierfür die SRC-, EGFR-, JNK- und MAP-Kinase. Die Fokussierung in dieser Arbeit lag auf der SRC-Kinase, da diese in Vorexperimenten das bei weitem stärkste Phosphorylierungssignal zeigte.



**Autophos.      JNK      src      β-IRK**

Abb. 2.3.: Calretikulin wurde phosphoryliert durch SRC Kinase, JNKinase und β-IR Kinase in Anwesenheit von radioaktiv markiertem ATP. Dargestellt ist eine Autoradiographie des phosphorylierten Calretikulins auf einem Acrylamidgel. Die bei weitem stärkste Phosphorylierungsreaktion erfolgte durch die SRC-Kinase.

Die SRC-Kinase wird in allen Zelllinien exprimiert. Sie gehört zur Gruppe der sogenannten *nonreceptor* Tyrosin-Kinasen. Die Aktivität der SRC-Kinase wird über verschiedenste Rezeptoren, wie Rezeptor-Protein-Kinasen, Integrin Rezeptoren, G-Protein gekoppelte Rezeptoren, Antigen- und Fc-gekoppelte Rezeptoren, Zytokin-Rezeptoren und Steroid-Hormon-Rezeptoren vermittelt (*Thomas et al., 1997*). Die SRC-Kinase setzt sich aus mehreren verschiedenen Domänen wie SH2, SH3, Protein-Tyrosin-Kinase und am C-terminalen Ende aus einer regulatorischen Einheit zusammen. Das SRC-Protein besteht aus 536 Aminosäuren. Die Domäne für die Protein-Tyrosin-Kinase befindet sich zwischen den Aminosäuren 270 und 523. Die Rolle von SRC für Zelldifferenzierung, Proliferation, Zellmorphologie und –motilität ist immens wichtig. Die Kinase wird mittels Autophosphorylierung am Tyr 416 aktiviert. Dies ist jedoch nur möglich, wenn zuvor am Tyr 527 ein Phosphat abgespalten wird (*Roskoski 2004a*).

EGFR ist ein 180 kDa schwerer Tyrosin-Kinase-Rezeptor an der Oberfläche. Er besteht aus einer Bindungsstelle für Wachstumsfaktoren, einem Transmembransegment, der katalytischen Domäne für die intrazelluläre Protein-Tyrosin-Kinase, und einen Tyrosin enthaltenden zytoplasmatischen Anteil (*Roskoski 2004b*). Bei vielen Tumoren epithelialen Ursprungs ist EGFR wichtig für dessen Wachstum (*Yonada et al., 1991*). Die Rezeptor-Kinase ist involviert in der Genexpression von c-fos sowie der DNA- und Proteinsynthese. Angiotensin II vermittelte *extrazellulär signal-regulated kinase* (ERK)-Aktivierung führt zu einer Transaktivierung von EGFR in VSMC via  $\text{Ca}^{2+}$ -Triggerung (*Matsubara et al., 2001; Saito et al., 2000*).

Die Involvierung von Tyrosin-Kinasen in die Signaltransduktion ist gesteuert von Wachstumsfaktoren wie z. B. *epidermal growth factor* (EGF) oder *platelet-derived growth factor* (PDGF) (*Marshall, 1995*) sowie durch weitere Hormone wie Angiotensin II.

Phosphatasen werden in PP1 und PP2 unterschieden. Dabei wird PP2 in drei Isoformen, der spontan aktiven Form PP2A, der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen PP2B und der  $\text{Mg}^{2+}$ -abhängigen PP2C unterteilt (*Cohen, P. 1994.; Wera et al., 1995*). Sowohl PP1 als auch PP2A bestehen aus komplexen Holoenzym-Strukturen (*McCluskey et al., 2001*) und besitzen katalytische und regulatorische Untereinheiten.

PP1 besteht aus einer konstanten katalytischen und einer oder zwei variablen regulatorischen Subdomänen. Die katalytische Einheit des PP1 umfasst 37 kDa. Der regulatorische Anteil des PP1 ist verantwortlich für die Aktivität als Phosphatase. PP1 ist an vielen zellulären Vorgängen wie Calcium-Transport, Muskelkontraktion, Proteinsynthese und intrazellulären Transport beteiligt (*Wera et al., 1995*).

Von PP2A existieren mehrere Holoenzym-Formen. Die katalytische Einheit ist 36 kDa groß, während das regulatorische Zentrum verschiedene Subspezies unterschiedlicher Größe aufweist. Eine *in vitro* gezeigte Phosphorylierung der katalytischen Untereinheit am Tyr 307 am C-terminalen Ende durch Tyrosin-Kinasen wie EGFR, Insulin Rezeptor oder viraler SRC führen zu einer 90-prozentigen Aktivitätsabnahme (*Yokoyama et al., 2001; Janssens et al., 2001*); Dephosphorylierung reaktiviert die Phosphatase. Diese Reaktivierung wird durch den pharmakologischen Inhibitor Okadaic Acid verhindert. Unter bestimmten Bedingungen kann PP2A auch Tyrosinreste dephosphorylieren. Ein 37 kDa schweres Protein PTPA (*PTPase activator*) ist hierfür notwendig, welches in Anwesenheit von ATP und  $\text{Mg}^{2+}$

die Tyrosin-Phosphatase-Aktivität zu steigern im Stande ist. PP2A ist beteiligt an zellulären Prozessen wie Metabolismus, Muskelkontraktion, synaptische Fortleitung, Signaltransduktion und Zellzyklusregulation. Die regulatorische Untereinheit des PP2A ist für die Substratspezifität verantwortlich (*Wera et al., 1995*). Der katalytische Bereich ist durch posttranslationelle Phosphorylierung und Methylierung reguliert (*Liu et al., 2002*).

PP2B bzw. Calcineurin besteht aus einer 60 kDa großen katalytischen (Calcineurin A) und einer 19 kDa schweren regulatorischen Einheit (Calcineurin B). Es spielt eine Rolle bei der T-Zell Aktivierung und  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierter Genexpression.

PP2C ist ein 43 bis 48 kDa schweres Protein, welches ursprünglich als  $\text{Mg}^{2+}$ -abhängige Protein-Phosphatase entdeckt wurde. Neuere Studien zeigen auch die Rolle bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Signaltransduktion im Gehirn auf (*Wera et al., 1995*).

## **2.6 Ziele dieser Arbeit**

Die posttranskriptionelle Destabilisierung der AT1-Rezeptor mRNA im Zytoplasma wird durch Calretikulin vermittelt. Calretikulin wird nach Bindung von Angiotensin II an den AT1-Rezeptor phosphoryliert. Dies ist Voraussetzung für die Interaktion mit der 3'-untranslatierte Region der AT1-Rezeptor mRNA, die letztlich eine Abnahme der Rezeptordichte auf der Zelloberfläche zur Folge hat. Ziel der Arbeit war es, die zur Aktivierung des Calretikulins notwendigen Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsmechanismen genauer zu analysieren.



## 3. Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Verwendete Materialien

30 % Acrylamide/Bis Solution 29: 1, Biorad, Ismaning

Adenosintriphosphat (ATP), *Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Steinheim

Ammoniumazetat, *Merck*, Darmstadt

Ammoniumpersulfat

Ampicillin, *Roche*, Mannheim

Angiotensin II, *Sigma*, Steinheim

Anti-Calretikulin AK, *Biomol SPA 600*, Hamburg

*Novus*, Littleton, USA

Anti-Mouse, *Sigma*, Steinheim

Antiphosphotyrosin, *Upstate*, Lake Placid

Antiphospho-MAP Kinase, *Upstate*, Lake Placid

Anti-Rabbit, *Sigma*, Steinheim

Anti-Calretikulin, *Upstate*, Lake Placid

AT1-cDNA

Bacto Agar, *Difco*, Detroit

Bench Mark Protein Ladder, *Invitrogen*, Carlsbad

Bromphenolblau, *Sigma*, Steinheim

Calretikulin, *Sigma*, Steinheim

Calziumchlorid, *Merck*, Darmstadt

Cantharidin, *Roth*, Karlsruhe

Chloroform, *Sigma*, Steinheim

CIAP Enzym, *Fermentas*, St. Leon Rot

CIAP Puffer, *Fermentas*, St. Leon Rot

Complete mini EDTA Free Tabletten, *Roche*, Mannheim

Cytidintriphosphat (dCTP radioaktiv)

Denhardt's Solution, *Merck*, Darmstadt

Di-Natriumhydrogenphosphat, *Merck*, Darmstadt

Diethylpyrocarbonat, *Sigma*, Steinheim

Dinatriumhydrogenphosphat, *Merck*, Darmstadt

Dodecylsulfat (SDS), *Merck*, Darmstadt

DTT

DMSO Dimethylsulfiddioxid, *Sigma*, Steinheim

EGFRas, Prof. Saghir Akhtar, Welsh school of Pharmacy, Cardiff, England

ECL, *Amersham*, Freiburg

Elution H<sub>2</sub>O, *Ambion*, Huntingdon, England

Ethanol absolut, *Merck*, Darmstadt

Ethidiumbromid, *Sigma*, Steinheim

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), *BDH Laboratory Supplies*, England

EGTA, *Sigma*, Steinheim

Fetal bovin serum, *Invitrogen*, Carlsbad

Formaldehyd, *Sigma*, Steinheim

Formamid, *Sigma*, Steinheim

Glycerol, *Sigma*, Steinheim

Glycin, *Merck*, Darmstadt

Guanintriphosphat (GTP), *Sigma*, Steinheim

HEPES, *Serva*, Heidelberg

INVaF Bakterien Stamm, *Invitrogen*, Carlsbad

Isopropanol, *Merck*, Darmstadt

Kaliumchlorid, *Merck*, Darmstadt

Kaliumdihydrogenphosphat, *Merck*, Darmstadt

Kanamycin, *Roche*, Mannheim

Lithiumchlorid, *Roth*, Karlsruhe

Low range protein ladder, *Biorad*, Ismaning

Lysozym, *Sigma*, Steinheim

Methanol, *Merck*, Darmstadt

Morpholinopropan Sulfonsäure (MOPS), *Sigma*, Steinheim

Natriumacetat, *VWR*, Darmstadt

Natriumacetattri-hydrat, *Merck*, Darmstadt

Natriumchlorid, *Roth*, Karlsruhe

Natriumdihydrogenphosphatmonohydrat, *Merck*, Darmstadt

Natriumfluorid, *Sigma*, Steinheim

Natriumhydroxid, *Merck*, Darmstadt

Natriumorthovanadat, *Sigma*, Steinheim

Okadaic Acid, *Calbiochem*, Darmstadt

Omniscript-Kit 200, *Qiagen*, Hilden

Optimem, *Invitrogen*, Carlsbad

Orthovanadat, *Sigma*, Steinheim

PCR Reaktionbuffer, *Roche*, Mannheim

PCR Nukleotid Mix, *Roche*, Mannheim Mannheim

Penicillin/Streptomycinlösung, *Invitrogen*, Carlsbad

Phenol-Chloroform-Isoamyl-Alkohol, *Sigma*, Steinheim

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), *Sigma*, Steinheim

PP1s , Prof. Dr. M. Bollen, Leuven, Belgien

Prime IT Kit II, *Stratagene*, Amsterdam, Niederlande

2-Propanol (Isopropanol), *Roth*, Karlsruhe

Protein A Agarose, *Roche*, Mannheim

Proteinbestimmung nach Lowry, *Biorad*, Ismaning

Qiagen, Miniprep Kit, *Qiagen*, Hilden

Random Primer, *Roche*, Mannheim

Refobacin, *Merck*, Darmstadt

Restriktionsendonukleasen, *Roche/Fermentas*

RNA-Clean, *PeqLab*, Erlangen

RNA-Inhibitor, *Promega*, Mannheim

RNase, (DNase frei), *Roche*, Mannheim

Salzsäure, *Merck*, Darmstadt

SDS Sodium Dodecyl Sulphat, *VWR*, Darmstadt

SOB, *Invitrogen*, Carlsbad

SRC sense

SRC antisense

SS DNA, *Invitrogen*, Carlsbad

*Sigma*, Steinheim

Sybr. Green Mastermix Kit, *Invitrogen*, Carlsbad

T4 DNA-Ligase, *Roche*, Mannheim Mannheim

T4 DNA-Ligasepuffer, *Roche*, Mannheim

Temed, *Fluka*, Buchs

Trinatriumcitrat, *Merck*, Darmstadt

TrisHCl, *Sigma*, Steinheim

Trishydroxyethylaminomethanacetat (TrisAcetat), *Sigma*, Steinheim

Triton X 100, *Sigma*, Steinheim

Trypsin, *Invitrogen*, Carlsbad

Tyrphostin 47, *Fluka*, Buchs

Tryptone, *Roth*, Karlsruhe

Uridintriphosphat (UTP), *Ambion*, Huntingdon, England

Western Blocking Solution, *Roche*, Mannheim

Xylen Xyanol F, *Sigma*, Steinheim

Yeast Extract, *Sigma*, Steinheim

Zellkulturmedium, *Invitrogen*, Carlsbad

### 3.1.2 Geräte

Agfa Curix Entwickler

Cell Scraper, *Saarstedt*

Falcon Inkubationsgefäße, *Greiner*, Frickenhausen

Feinwaage, *Kern 770*

Gene Pulser II, *Biorad*, Hemel Hempstead, BG

Heizblock, Thermomixer Comfort, *Eppendorf*

Inkubator Heracell Kendro, *Langenselbold*

Kompressen 10cm, *Fink & Walter*, Merchweiler

PCR Mastercycler, *Eppendorf*

Petrischalen, *Renner*, Dannstadt-Schauernheim

Gene Pulser Cuvetten 2MM, *Biorad*, Hemel Hempstead, BG

PH-Meter, *WTW*, Weilheim

Photometer

Schüttler

Spannung Gel, Consort E831, *peqlab*, Erlangen

Stratalinker 2400 (UV-Crosslinker), *Stratagene GmbH*, Deutschland

Ultraschallbad, *Bandelin electronic*, Berlin

Zentrifugen:

- Laborzentrifuge 1K 15 (Kühlzentrifuge), *Sigma*, Steinheim
- Biofuge pico, *Heraeus GmbH*,
- Zentrifuge 5415 C, *Eppendorf*, Köln

Waage Kern EW

Wasserbad GFL 1086, Burgwedel

### 3.1.3 Lösungen und Puffer

DNA-Gel (für 100 ml) 1 g Agarose, 100 ml TAE. Das Gemisch wird erhitzt bis die Agarose gelöst ist. Nach Abkühlung werden 4 µl Ethidiumbromid beigefügt. Das Gel wird dann in den hierfür bereitgestellten Schlitten gegossen. Nach dem Erhärten kann es für die Gelelektrophorese verwendet werden.

DNA-Probenpuffer: 50 % Glycerin (v; v); 0,05 % Bromphenolblau; 0,05 % Bromphenolblau (w; v); 0,05 % Xylenxyanol (w; v).

Hybridisierungslösung: 50 % Formamid, 20 x SSC, 10 % SDS, DEPC-H<sub>2</sub>O.

Ethanol 70%: 25 ml Ethanol absolut, 15 ml DEPC-H<sub>2</sub>O.

Gelelution: Quiagen Gel Extraction Kit 50; Benutzung erfolgt nach Protokoll der Herstellerfirma.

GET-Lösung (1000ml): 50 mM Glucose (9 g), 25 mM Tris (3,0275g), 10 mM EDTA (2,72g), pH 8,0, Ampuwa.

Harvest Puffer: 50 mM HEPES, 1 % Triton X 100, 150 mM NaCl, 0,1 mg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Leupeptin, 2 mM Na-Orthovanadat, 100 mM Na-Fluorid, 4 mM EDTA.

Immunopräzipitation Wasch Puffer: 40 mM TrisHCl (pH 8,0), 500 mM NaCl, 6 mM EDTA, 6 mM EGTA, 10 mM Na-Fluorid, 300 µM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM DTT, 1x Tablette Complete mini EDTA free pro 10 ml Wasch Puffer.

Kaliumazetat (1000ml): 490,75 g Kaliumazetat, 11,5 ml Eisessig, 28,5 ml Aqua dest.

LB-Agar Nährböden (pro Liter): 10 g Natriumchlorid, 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 20 g Agar; mittels NaOH wird der pH auf 7,0 eingestellt; nach Autoklavierung kann das Gemisch in bereitgestellte Petri-Schalen gegeben werden; eine Anzucht von Bakterien kann nach Abkühlung und Erhitzen erfolgen.

Lithiumchlorid (100ml): 21,2 g Lithiumchlorid, Ampuwa.

Loading dye: 7 ml dest. H<sub>2</sub>O, 3 ml Glycerol, Xylen Cyanol F, Bromphenolblau.

Lysozym in Tris HCL: 10 µg Lysozym pro ml Tris HCL.

Mini Präp Kit: Qiagen Minipräp Kit 250: Puffer P1, P2, P3, N3, PE, EB. Benutzung erfolgt nach dem Protokoll der Herstellerfirma.

MOPS-Puffer (20x) pH 8,0: 83,6 g Morpholinopropansulfonsäure, 13,61 g 3 M Natriumacetat trihydrat, 7,45 g 0,5 M EDTA, pH 8,0, in DEPC-H<sub>2</sub>O.

NaOH-SDS: 10 ml 1 % SDS in 90 ml steril H<sub>2</sub>O; hiervon werden 98 ml mit 2 ml 10 M NaOH versetzt.

Northernblot-Sonde: 19 µl DEPC-H<sub>2</sub>O, 10 µl dCTP Random Primer, 5 µl AT1-cDNA werden für 5 min. bei 95 °C inkubiert, anschließend werden 10 µl Primer Puffer, 1 µl Klenow Enzym, 5 µl (50 µCi) dCTP hinzugegeben; dies wird nun für 20 min. bei 27 °C erwärmt; nach Hinzufügen des StopMix wird die Sonde per Säule gefiltert und danach für 5 min bei 95 °C inkubiert.

Phosphate-buffered saline (PBS): 137 mmol/l Natriumchlorid, 2,7 mmol/l Kaliumchlorid, 8,1 mmol/l Dinatriumhydrogenphosphat, 1,5 mmol/l Kaliumdihydrogenphosphat, pH 7,0-7,2, Aqua dest.

Prähybridisierungslösung: 50 % Formamid, 20 x SSC, 10 % SDS, Denhard's Solution, DEPC-H<sub>2</sub>O.

RNA-Gel-Ladepuffer: 50 % Glycerol, 1 mmol/l EDTA, pH 8,0, 0,25 % (w; v) Bromphenolblau, 0,25 % (w; v) Xylene Cyanol.

RNA-Formaldehydgel: 1,8 g Agarose, 140 ml DEPC-H<sub>2</sub>O, 7,5 ml 20 x MOPS, 2,7 ml Formaldehyd 37 %.

RNA-Puffer (pro Sample): 10 µl Formamid, 4,4 µl 37 % Formaldehyd, 1,25 µl 20x MOPS, 2 µl loading dye, 0,1 µl Ethidiumbromid.

SOC-Medium : 99 ml SOB Medium und 1 ml 2 M autoklavierte Glukose-Lösung; wurde bereits fertig mitgeliefert.

20 x SSC (pro Liter): 175 g NaCl, 100,5 g Trinatriumcitrat, pH 7,0, dest. H<sub>2</sub>O.

20-fach SSRE (pro 2 l): 350 g NaCl, 55,2 g Natriumdihydrogen-phosphatmonohydrat, 15 g EDTA, pH 7,4, Aqua dest.



STE (für Northern Blot): 5 ml 1 M NaCl, 0,5 ml 1 M TrisHCl pH 8, 0,2 ml 1 mM EDTA pH 8, Aqua dest.

STE-Puffer(für 1000ml): 0,1 M NaCl, 0,01 M Tris Base, 0,001 M EDTA, pH 8,0, Ampuwa.

10x TBS (für 1000ml): 1 M Tris, 1,5 M NaCl, pH 8,2, Ampuwa.

10x TBS Tween (für 1000ml): 1 M Tris, 1,5 M NaCl, 1 M Tween 20, pH 8,2, Ampuwa.

TE-Puffer: 100 mM TrisHCl, 1 mM EDTA, pH 8,0, Ampuwa.

5x Transferpuffer (für 2000ml): 58 g Tris Base, 290 g Glycine, 10 g SDS, Ampuwa.

1x Transferpuffer(für 1000ml): 200 ml 5xTransferpuffer, 200 ml Methanol, 600 ml Ampuwa.

TrisHCL (100ml): 0,121 g TrisHCL, pH 8,0, Ampuwa.

VSMC-Nährmedium: Dulbecco's Mod Eagle Medium (Without Sodium Pyruvat, With 4500 mg/l Glucose, with Pyridoxine HCL), 50 ml Fetale bovine serum, 5 ml Penicillin-Streptomycin, 40 mg Gentamycin.

Western Blocking Solution: 10 % Western Blocking Reagenz, 90 % 1 x TBS.

2x YT Nährlösung (pro Liter): 10 g Natriumchlorid; 10 g Hefeextrakt; 16 g Trypton; mit NaOH auf pH 7,5 einstellen; autoklavieren.

### 3.1.4 Primer

AT1-sense	5'- GTC ATG ATC CCT ACC CTC TAC AGC -3'
AT1-antisense	5'- CCG TAG AAC AGA GGG TTC AGG CAG -3'
EGFPas forw	5'- AGC TTT TTC TTT TCC TGC AGA CGC CG -3'
EGFPas rew	5'- AAT TCG GGC TCT GCT GGA AAA GAA AA -3'
GAPDH-sense:	5'- CCT GGA CCA CCC AGC CCA GCA -3'
GAPDH-antisense	5'- TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA -3'
EGFPas KTRL forw.	5'- AGC TTC TGA TCC TGC TCT GAT CCT CTG -3'
EGFPas KTRL rew.,	5'- AAT TCA GAG GAT CAG AGC AGG ATC AGA -3'
SRC forw.	5'- ATG GGC AGC AAC AAG AGC AAG CCC AAG GAC GCC AGC CA -3'
SRC rew.	5'- ACA TAT AGG CCA AGG GCT GGG CCT TAT TCC TCT TTG GAA A -3'
PP2A forw.	5'- CAT CTT CCC TAG TTA CCC AGG ACA ACA CAT CGA GAA TTA A -3'
PP2A rew.	5'- GGG GCC GCC GTC GCT GTC CTA GCC GCC GCC GCT G -3'

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellkultur

#### 3.2.1.1 Glatte Gefäßmuskelzellen

Die verwendeten glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) entstammen der thorakalen Aorta von 6-10 Wochen alten, männlichen Spague-Dawley-Ratten (SD). Für die Experimente werden die Passagen 7 bis 12 verwendet.

#### 3.2.1.2 Kultivierung von VSMC

Die Kultivierung und Verwendung der Zellen geschieht unter sterilen Bedingungen. Zur Anzüchtung neuer Zelllinien werden in flüssigem Stickstoff eingefrorene Zellpopulationen verwendet. Die Zellen werden hierzu in 20 ml des bereits auf 37°C vorgewärmten VSMC-Nährmediums [Dulbecco's Mod Eagle Medium (DMEM) (Without Sodium Pyruvat, With 4500 mg/l Glucose, with Pyridoxine HCL), 10 % fetale Kälberserum (FKS), Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 µg/l) und 40 mg Gentamycin] gelöst. Zur Pelletierung der Zellen folgt ein Zentrifugationsschritt bei 1100 U/min für 5 min. Danach wird der flüssige Überstand abgesaugt und die Zellen werden in entsprechender Menge frischem VSMC-Nährmedium resuspendiert. Anschließend gibt man je 1 ml des Resuspendats in die mit 10 ml VSMC-Nährmedium gefüllten 10 cm großen Gewebekulturschalen. Die Kultivierung erfolgt 2 bis 3 Tage in einer 5 %-igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre bei 37 °C mit 100 % H<sub>2</sub>O-Sättigung der Luft. Ist ein 80-90 % konfluent gewachsener Zellrasen erreicht, subkultiviert man die Zellen mittels Trypsinierung. Die VSMC werden hierzu vom verbrauchten DMEM befreit, mit 2 ml Trypsin pro 10 cm Schale versetzt und bis zum Abrollen der Zellen in den Brutschrank gestellt. Nach Aufnahme in neuem Nähr-medium werden die glatten Gefäßmuskeln bei 1100 U/min für 5 min zentrifugiert und pelletiert. Der Überstand kann vorsichtig abgesaugt werden. Nach Resuspendieren der Zellen mit entsprechender Menge frischen Mediums erfolgt die Fraktionierung auf die vorbereiteten Gewebekulturschalen.

### **2.2.1.3 Stimulation mit Hemmstoffen**

Bei einer Zellrasendichte von ca. 80-90 % wird das FKS-Nährmedium durch 5 ml FKS-freies Medium ersetzt. Nach mind. 12 h Inkubationszeit im serumfreien Milieu wird die Stimulation durchgeführt. Angiotensin II wird bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  verwendet. Nach Ablauf der Stimulationzeit kann die RNA aus den Zellen isoliert werden (dazu siehe Punkt 3.2.1.5).

#### **Cantharidin**

Es handelt sich hierbei um ein Monoterpen mit der Summenformel  $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_1$ , das erstmals 1810 von Pierre Jean Robiquet isoliert wurde. Cantharidin hat eine hohe Affinität zur Bindung an Proteine, welche entsprechend als Cantharidin bindende Proteine (CBP) bezeichnet werden (*Li et Casida, 1992*). Das Protein besteht aus einer alpha-Kette und einer kürzeren beta-Kette. Diese CBP sind offensichtlich identisch mit der Protein-Phosphatase namens 2A (PP2A). PP2A ist möglicherweise für die Serin-Dephosphorylierung am Calretikulin verantwortlich. Die Zellen werden je nach Versuchsansatz mit unterschiedlichen Konzentrationen von 0,4  $\mu\text{M}$  bis 14  $\mu\text{M}$  stimuliert. Es werden auch Zeitabhängigkeitsversuche ohne und mit Anwesenheit von Angiotensin II durchgeführt.

#### **Okadaic Acid (OA)**

OA besitzt die Summenformel  $\text{C}_{44}\text{H}_{68}\text{O}_{13}$  und beeinflusst hauptsächlich Protein-Phosphatase 2A und 1. Hierbei wird mit unterschiedlichen Konzentrationen von 0,06 nM bis 15 nM stimuliert.

#### **Tyrphostin 47**

Tyrphostin 47 ist ein spezifischer Tyrosin-Kinase Hemmstoff, vor allem die EGFR (*epidermal growth factor receptor*)-Kinase wird hierbei inhibiert. Konzentrationen von 0,1  $\mu\text{M}$  bis 50  $\mu\text{M}$  kommen zum Einsatz.

### **Orthovanadat**

Orthovanadat  $\text{VO}_4^{3-}$  ist ein Analogon des Phosphat-Ions. In Anwesenheit von ADP formt es einen stabilen Komplex mit Myosin, der durch Denaturierung von Myosin gelöst werden kann. Weiterhin ist Orthovanadat ein kompetitiver Inhibitor der alkalischen Phosphatase aus verschiedenen Organismen (Mensch, E.coli, u.a.). Ebenso ist für Orthovanadat eine aktivierende Wirkung auf Protein-Tyrosin-Kinasen beschrieben (*Kim et al., 1999*). Es wird mit einer Konzentration von 1 mM stimuliert.

#### **3.2.1.4 Transfektion**

Die Einbringung von Fremd-DNA in VSMC erfolgt mit der Technik der Transfektion mittels Vektoren. Transfiziert werden die Vektoren sowohl mit enthaltenem Insert und als Kontrolle ohne Insert. 20 µg der durch Large-Präparation (siehe 3.2.2.2) erhaltenen DNA gibt man in entsprechende Küvetten und verbringt diese auf Eis. Bei einer Zelldichte von 80-90 % werden die VSMC trypsinisiert (2 ml/10 cm Schale), mit sterilem 1 x PBS abgewaschen und 3 Minuten bei 1100 rpm zentrifugiert. Nach vorsichtigem Absaugen des Überstandes wird mit entsprechender Menge Optimum I resuspendiert und von den gelösten Zellen 200 µl pro Küvette zur vorbehandelten DNA gegeben. Nach 15 min auf Eis und 30 sek. bei 37 °C wird die Elektroporation (300 V, 500 µF) mittels Gene Pulser II von BioRad durchgeführt. Je 130 µl der Lösung werden auf die bereitgelegten 6 cm Kulturschalen verbracht. Nach Zusatz von 6 ml Nährmedium inkubiert man die Zellen für mind. 12h bei 37 °C im Brutschrank. Am Folgetag wird das Wachstumsmedium durch serumfreies Medium ersetzt. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 12 h stimuliert man jeweils die Hälfte der transformierten Kulturen mit Angiotensin II für 4 h. Anschließend wird eine Isolation der Gesamt RNA (siehe 3.2.1.5) durchgeführt und mittels photometrischen Verfahren die RNA Menge bestimmt.

### **3.2.1.5 Isolation von Gesamt RNA**

Zur Isolation der RNA aus kultivierten VSMC wird RNA-Clean verwendet. Nach Entfernung des FKS-freien Mediums wird 1 ml RNA-Clean zur Lyse des Zellverbandes pro Kulturschale (6 bzw. 10 cm Durchmesser) gegeben, der Zellrasen mittels CellScraper abgeschabt und das Gemisch in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß übernommen. Zur Trennung von Nukleinsäure- und Proteinfraction wird je 300 µl Chloroform hinzugegeben und gemischt, gefolgt von einem Zentrifugationsschritt für 20 min. bei 14000 U/min und 4 °C. Die obere wässrige Phase wird in ein frisches 1,5 ml großes Reaktionsgefäß überführt. Die so erhaltene RNA wird durch Zugabe von 1 ml 2-Propanol für 1 h oder über Nacht bei -20 °C präzipitiert und durch Zentrifugation (1 h bei 14000 g, 4 °C) pelletiert. Der Überstand wird vorsichtig entfernt. Zum Reinigen der RNA gibt man 750 µl 70 % Ethanol hinzu und zentrifugiert 10 min. bei 14000 rpm und 4 °C. Nach Absaugen des Überstandes wird das Pellet für ca. 30 min. luftgetrocknet und in 20 µl RNase-freiem DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen. Fünf-minütiges Erwärmen bei 65 °C führt zum Lösen der RNA. Die RNA-Menge wird photometrisch durch UV-Absorption bei 260 nm bestimmt. Eine Kontrolle der enthaltenen RNA erfolgt mittels Elektrophorese durch Anfärbung mit Ethidiumbromid.

### **3.2.1.6 Immunpräzipitation aus transfizierten Zellen**

Die aus der Transfektion (siehe 3.2.1.4) stammenden glatten Gefäßmuskelzellen werden bei einer Zelldichte von ca. 90 % mit serumfreien Medium versetzt. Am Folgetag stimuliert man entsprechend dem Ansatz die Hälfte der Schalen mit Angiotensin II für 6 Minuten. Bei jeder Gruppe entspricht der 0 min.-Wert, ohne AngII Stimulation, der Negativkontrolle. Nach dem Absaugen des Mediums und Waschen mittels sterilem 1x PBS wird 500 µl Harvest Puffer pro Schale hinzu- gegeben, um anschließend den Zellrasen mittels Zellscraper abzulösen. Das Gemisch kommt nun für 15 min. auf Eiswasser in ein Ultraschallbad. Danach wird 5 min. (13000 Upm, 4 °C) zentrifugiert und der Überstand weiterverwendet, während das Pellet verworfen wird. Es folgt die Proteinbestimmung nach Lowry. Eingesetzt werden pro Versuch gleich große Mengen an Protein. Diese inkubiert man mit 1 µl Anti-Calretikulin-Antikörper bei 4 °C für mind. 2 h. Anschließend wird 50 µl gewaschene Protein A Agarose hinzu-

gegeben und für mind. 2 h oder über Nacht bei 4 °C im Rotator inkubiert. Nach Herabzentrifugieren (10000 U/min, 5 min., 4 °C) wird das Pellet mit Waschpuffer gereinigt. Es folgt eine Resuspendierung in 30 µl WB-Puffer und Denaturierung bei 95 °C für 5 min. Anschließend werden die Proben auf das Western Blot Gel (10 % Trenngel) aufgetragen und bei 80-120 V die einzelnen Proteinfractionen in der Western Blot Kammer voneinander getrennt. Als Marker dient der Bench Mark Protein Ladder. Nach erfolgter Elektrophorese können die Proteine auf eine Hybond-Membran mittels Blotting (1 h bei 350 mA) transferiert werden. Anschließend wird die Membran mittels Western Blocking Solution über Nacht unter kühlen Bedingungen geblockt. Es folgen mehrere Waschschriffe mit 1x TBS und 1x TBS Tween, ehe die Membran für 1 h bei Raumtemperatur mit dem ersten Antikörper, Antiphosphotyrosin bzw. Anti-Phospho-MAP-Kinase, inkubiert werden kann. Nach erneutem Waschen mittels 1x TBS bzw. 1x TBS Tween wird der 2. Antikörper, Anti-Mouse bei Antiphosphotyrosin bzw. Anti-Rabbit für Anti-Phospho-MAP-Kinase (beide 1:10000 verdünnt) für 15 min. bei Raumtemperatur hinzugefügt. Es folgen weitere Schritte zur Reinigung mit anschließender Sichtbarmachung der Proteinbanden mittels ECL-Belichtung. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms LabWorks der Firma UVP, Cambridge, England.

### **3.2.1.7 Immunpräzipitation aus nicht transfizierten Zellen**

Die Kultivierung der Zellen (VSMC) erfolgte wie in 3.2.1.2. beschrieben. Anschliesend werden die Zellen bei einer ausreichenden Zelldichte für ca. 18h mit FKS-freiem Medium versetzt. Es folgt eine Stimulation der VSMC für 5, 10 und 15 min mit Angiotensin II. 0 min entspricht der unstimulierten Kontrolle. Calretikulin wird mittels Immunpräzipitation eluiert und mit Western Blot Technik analysiert. Zur Testung der Tyrosin bzw. Serin- Phosphorylierung von Calretikulin werden verschiedene Antikörper verwendet.

## **3.2.2 Herstellung von DNA Konstrukten**

### **3.2.2.1 DNA-Gewinnung durch Transformation und Minipräparation**

Die für viele Experimente erforderlichen DNA-Mengen werden über das Verfahren der Mini-Präparation mittels des gleichnamigen Kits der Firma Qiagen gewonnen. Dazu

werden 20 µg der Plasmid DNA auf folgende Weise in kompetente Escherichia Coli Bakterien transformiert:

100 µl der kompetenten E. coli werden unter gelegentlichem Schütteln für 15 min. auf Eis aufgetaut. Anschließend erfolgt die Zugabe der DNA. Nach weiteren 15 min. auf Eis wird das Reaktionsgemisch im konstant 42 °C warmen Wasserbad für genau 45 Sekunden erhitzt und die DNA in die kompetenten E. coli transformiert. Einer erneuten 1-minütigen Kühlung folgt die Zugabe von 250 µl SOB-Medium. Die Bakterien werden in dieser Nährlösung eine Stunde bei 37 °C und 300 Upm belassen. Zur Selektion der erwünschten Plasmide erfolgt die Ausplattierung von 5, 20, 100 µl Chargen auf LB-Agar Platten, denen zuvor ein Antibiotikum beigefügt wird. Die in vorliegender Arbeit verwendeten Plasmide besitzen Resistenzen gegen Ampicillin oder Kanamycin, daher enthalten die Nährlösungen entsprechend die genannten Antibiotika in einer Konzentration von 20 µg/ml, um jedes unerwünschte Wachstum auszuschließen. Nach einem Zeitraum von 12-18 h bei 37 °C im Brutschrank können von den Platten Einzelkolonien abgenommen werden, mit denen die Beimpfung von ca. 4-5 ml 2 YT-Medium erfolgt. Diese verbleiben erneut für 12-18 Stunden bei 37 °C unter ständiger Bewegung (300 U/min) im Rüttler. Eine unbeimpfte Kolonie dient der Negativkontrolle, um eine eventuelle Kontamination der Lösung mit resistenten Fremdbakterien zu erkennen. Im letzten Schritt wird die Plasmid-DNA nach dem Standardprotokoll für Minipräp DNA-Isolierung der Firma Qiagen über mehrere Lyse- und Zentrifugationsstufen unter Verwendung der im gleichnamigen Kit gelieferten Lösungen isoliert.

### **3.2.2.2 Plasmid-Isolation mittels Large-Präparation**

Die Large-Präparation dient zur Isolierung größerer Plasmid-Mengen aus E. coli. Zur Vermehrung werden 400 ml LB- bzw. 2 YT-Medium über Nacht bei 37 °C und 200 rpm mit E. coli beimpft, welche das gewünschte Plasmid enthalten. Zur Vermeidung eines unspezifischen Bakterienwachstums wird 400 µl des entsprechenden Antibiotikums zugegeben, gegen welches das erwünschte Plasmid eine Resistenz besitzt. Bei erfolgreichem Anwachsen erfolgt die Isolation der bakteriellen DNA wie folgt: Dazu wird das Medium für 15 min. bei 4500 U/min und 4 °C zentrifugiert. Nach Abkippen des Überstandes und Lufttrocknung für etwa 15 min. wird das erhaltene Bakterien-Pellet mit 20 ml eisgekühlten STE-Puffer gewaschen (15 min., 4500 rpm, 4 °C). Es folgt die Auflösung des getrockneten Pellets in 10 ml GET-Lösung. Durch



Zugabe von 1 ml frisch angesetztem Lysozym-HCl und 20 ml NaOH-SDS kommt es zur Lyse der Bakterien und zur Ausfällung der Salze. Das Gemisch wird 10 min. bei Raumtemperatur belassen und anschließend mit 15 ml eisgekühltem Kaliumazetat versetzt. Nach 15 min. auf Eis erfolgt für 15 min. eine Zentrifugierung bei 4500 U/min und 4 °C. Den flüssigen Anteil filtriert man mit Hilfe steriler Kompressen in neue Reaktionsgefäße, welche mit Isopropanol versetzt und für 10 min. auf Eis inkubiert werden. Es folgt eine weiterer Zentrifugationsschritt (15 min., 4500 rpm, Raumtemperatur). Nach Trocknung des Pellets bei Raumtemperatur löst man dieses in 3 ml TE-Puffer. Zum Ausfällen unerwünschter RNA werden 3 ml eiskalte 5 M Lithiumchlorid-Lösung zugegeben, gemischt und für 10 min. zentrifugiert (10000 Upm, 4 °C). Den Überstand vermischt man mit gleichem Volumen Isopropanol und pelletiert für 15 min. (13000 U/min, RT). Nach etwa ½-stündiger Lufttrocknung wird mit 500 µl TE-Puffer resuspendiert. Hierzu gibt man je 25 µl RNase (DNase frei) für 25 min. bei Raumtemperatur, um die restliche unerwünschte RNA zu zerstören. Durch Zugabe von 500 µl Isopropanol und Zentrifugation für 10 min. (14000 U/min 4 °C) lässt sich die noch vorhandene RNA heraustrennen. Das Pellet trocknet nachfolgend für 25 min. um anschließend in 400 µl TE-Puffer gelöst zu werden. Man vermischt dies mit 400 µl Phenol-Chloroform-Isoamyl-Alkohol (PCIA). Die Auftrennung in verschiedene Phasen erfolgt durch 5 min. Zentrifugation bei 14000 Upm und 4 °C. Die obere Phase wird nun mit 100 µl 10 M Ammoniumacetat und 2 Volumen Isopropanol versetzt. Nach 10 Minuten bei -20 °C wird erneut zentrifugiert (14000 U/min 4 °C) und das Pellet getrocknet um zuletzt in sterilem Wasser gelöst und bei -20 °C eingefroren zu werden. Die Quantifizierung der DNA-Menge erfolgt bei 260 nm Wellenlänge im Photometer am nächsten Tag. Die gewonnenen Klone können zur Transfektion (siehe 3.2.1.4) benutzt werden.

### **3.2.2.3 Kontrolle der Plasmid DNA durch Restriktionsverdau**

Der Restriktionsverdau dient zum Ausschluss eventueller Mutationen, bzw. Fehlklonierungen. Hierbei wird die gewonnene DNA mittels spezifischer Enzyme an bestimmten Stellen geschnitten. Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich, Inserts aus dem Plasmid herauszuschneiden. Als Restriktionsenzyme dienen EcoR1 und Hind III. Die Durchführung erfolgt nach Herstellerangaben der Firmen Roche bzw. Fermentas. Zur Beurteilung des Restriktionsverdau, d.h. zur Überprüfung ob sich das gesuchte

Insert im Vektor befindet, wird eine DNA-Gelelektrophorese durchgeführt. Die Proben werden mit Auftragspuffer versetzt und mittels Elektrophorese bei 80 V für 30 min. aufgetrennt. Zeigt sich das entsprechende Insert bei der zu erwartenden Fragmentgröße, extrahiert man dieses mittels Gelelektion (siehe 3.2.2.5) aus dem Gel. Für jede eluierte Probe führt man eine Sequenzanalyse durch.

### 3.2.2.4. Klonierung von DNA- Fragmenten in Vektoren

Zum späteren Einbringen der gewünschten DNA-Fragmente in die glatten Gefäßmuskelzellen ist es nötig, diese vorher in Vektoren wie pcDNA3 sowie pEGFR zu klonieren. Restriktionsenzyme wie z.B. Eco-R1 bzw. Hind III dienen dem Herausschneiden der entsprechenden DNA-Abschnitte aus ihren Ursprungsvektoren. Die Vektoren werden ebenfalls mit den gleichen Enzymen geschnitten. Zudem dephosphoryliert man die Vektoren mittels CIAP-Verdau. Die Kontrolle erfolgt nach Zugabe von DNA-Ladepuffer durch Elektrophorese für 30 min. bei 70 V. Die erhaltenen DNA-Abschnitte ligiert man nun mit dem ebenfalls geschnittenen Vektor nach Herstellerangaben der Firma Roche, um sie anschließend in kompetente Escherischia Coli Bakterien transformieren zu können (siehe 3.2.2.1). Eine Kontrolle der Klonierung wird mittels Restriktionsverdau (siehe 3.2.2.3) und Sequenzierung erbracht.

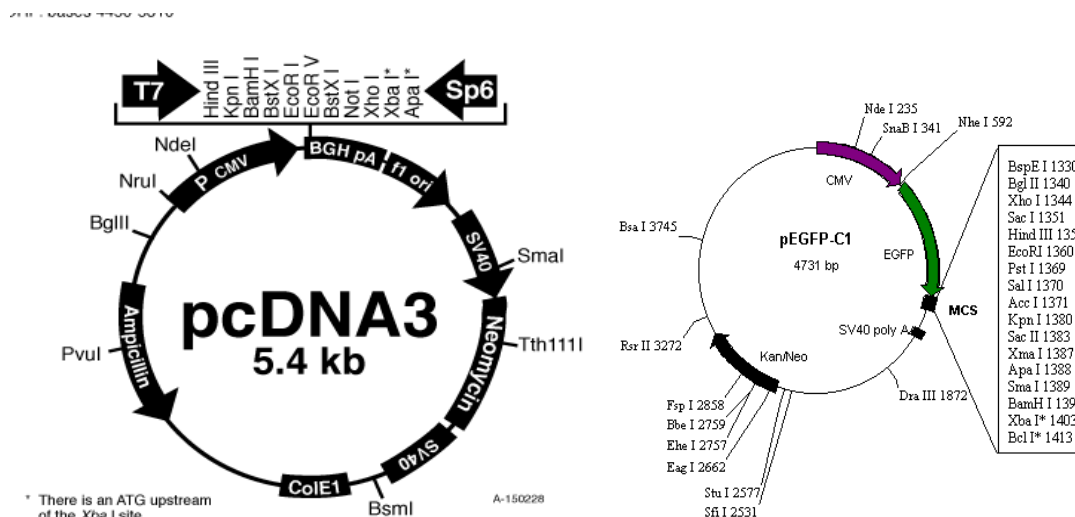


Abb.3.1.: Sequenzen der Vektoren pcDNA3 und pEGFP.

### **3.2.2.5 Gelelution**

Die Gelelution wird mit dem Gel Extraction Kit (50) von Qiagen nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Konzentration kann photometrisch bei 260/280 nm Wellenlänge bestimmt werden. Der Rest wird bei -20 °C aufbewahrt.

### **3.2.2.6 Glyzerolstocks**

Um den in den Bakterien enthaltenen Vektor inklusive Klon für längere Zeit haltbar zu machen, friert man diese als Glyzerolstock bei -80 °C ein. Vor der ersten Pelletierung beim Mini-Präparation wird 1 ml der gelösten Bakteriensuspension mit 500 µl Glycerol vermischt und dann bei -80 °C verbracht. Bei Bedarf kann zu einem späteren Zeitpunkt dies zur Anzucht neuer Kolonien verwendet werden.

## **3.2.3 Experimente zur mRNA Stabilität**

### **3.2.3.1 Northern-Blot Experimente und Herstellung radioaktiv markierter cDNA-Sonden**

Für diese Versuchsanordnung werden 10 µg der durch Isolation (siehe 3.2.1.5) erhaltenen RNA auf einem RNA-Formaldehydgel mittels Elektrophorese für 90 min. bei 90 V aufgetrennt, dann durch Kapillarblot auf eine Hybond N Nylon Membran überführt und mittels UV-Bestrahlung mit der Membran kreuzvernetzt. Bei der AT1-Rezeptor cDNA, die als Template zur Herstellung der radioaktiven Sonde dient, handelt es sich um ein 824 Nukleotide langes Fragment der Ratte. Mit den Primern 5'-GTC ATG ATC CCT ACC CTC TAC AGC -3' und 5'-CCG TAG AAC AGA GGG TTC AGG CAG -3' wird es mittels RT-PCR aus glatten Muskelzellen gewonnen. Die PCR erfolgt mit 35 Zyklen bei Temperaturen von jeweils einer Minute bei 55 °C, 72 °C und 95 °C. Ein 419 bp langes Template für die Herstellung einer Sonde zur Detektion von Calretikulin mRNA wird unter denselben Bedingungen mit den Primern 5'-TTG GCC TCC TCG GCT TGG CT -3' und 5'-TAA AGA TGA CAT GAA CCT TC -3' hergestellt. Die radioaktive Markierung der Sonden erfolgt basierend auf der Methode des *random prime labeling* mit dem Prime It II Random Primer Kit und  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-dCTP als radioaktives Desoxynukleotid. Die AT1-cDNA wird für 15 min. bei 70 °C denaturiert.

Vor dem Platzieren der Membran werden die Hybridisierungsröhren mit 2x SSC gewaschen. SS-DNA wird für 5 min. bei 95 °C denaturiert, 2 min. auf Eis gestellt und anschließend davon 100 µl zur Prähybridisierungslösung (50 % Formamid, 20 x SSC, 10 % SDS, Denhard's Solution, DEPC-H<sub>2</sub>O) hinzugegeben. Die Membran muss in der Prähybridisierungslösung für mindestens 30 min. bei 42 °C prähybridisieren. Die hergestellte Sonde (38 % DEPC-H<sub>2</sub>O, 20 % dCTP Random Primer, 10 % AT1-cDNA, dann 5 min. 95 °C, 20 % Primer Puffer, 2% Klenow Enzym, 10 % (50 µCi) dCTP) soll für 20 min. bei 37 °C inkubieren. Nach Hinzufügen des StopMix wird die Sonde durch eine spezielle Säule filtriert und danach für 5 min. bei 95 °C verbracht. Die Prähybridisierungslösung kann verworfen und die Sonde zur Hybridisierungslösung (50 % Formamid, 20x SSC, 10 % SDS, DEPC-H<sub>2</sub>O) hinzugegeben werden. Die Hybridisierung mit den radioaktiv markierten Sonden erfolgt über Nacht bei 42 °C. Anschließend werden die Membranen zweimal mit 2 x SSC bei Raumtemperatur und einmal mit 2 x SSC / 0,1 % SDS bei 50 °C für 0,5 h gewaschen, in Folie eingeschweißt und die radioaktiv markierten Banden durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

### **3.2.3.2 Reverse Transkription**

Unter der Reversen Transkription (RT) versteht man eine enzymatische Reaktion, bei der mittels des Enzyms Reverse Transkriptase mRNA in einzelsträngige cDNA (*complementary* DNA) „zurückgeschrieben“ wird. Verwendung hierbei findet der Omniscript-Kit der Firma Qiagen. Für die Reaktion benötigt man 2 µg der durch RNA-Isolation (siehe 3.2.1.5) erhaltenen RNA. Um ausschließlich die AT1 bzw. GAPDH umzuschreiben, dienen spezifische Primer [AT1 sense, AT1 antisense, GAPDH sense, GAPDH antisense; Sequenzen (siehe 3.1.4)]

### **3.2.3.3 Quantitative-PCR**

Die Quantitative PCR (Q-PCR) ist eine Methode zur quantitativen Messung kleiner Mengen DNA. Hierbei wird die DNA-Menge während der Reaktion in jedem Ansatz gemessen. Das Prinzip beruht auf einer Fluoreszenz-Zunahme eines zugegebenen Farbstoffes, der mit der DNA interkaliert. Dazu wird Sybr-Green I dye verwendet. Mittels Fluoreszenz-Messung nach jedem Zyklus ist es möglich auf die vorhandene DNA-Menge zu schließen. Zur genauen Quantifizierung verwendet man standardisierte DNA-Mengen. Die Herstellung dieser Standards erfolgt durch *run off*-Transkription der gewünschten DNA-Sequenz in RNA und durch das Umschreiben über Reverse Transkription in cDNA. Die DNA-Konzentration wird photometrisch ermittelt und in entsprechenden Konzentrationen (hier 0,1 ng, 1 ng, 10 ng, 100 ng) als Standard in die Q-PCR eingesetzt. Der Versuch erfolgt nach den Herstellerangaben von Applied Biosystems. Als Primer werden AT1-sense und AT1-antisense sowie GAPDH-sense und GAPDH-antisense verwendet. Nach Erhitzen der Proben für 1 min. auf 95 °C sind 40 Zyklen mit jeweils 15 sek. 95 °C und 1 min. 60 °C zu durchlaufen.

## **3.3. Auswertung**

Die angegebenen Daten wurden als Mittelwert +/- Standardabweichung des Mittelwertes (Stabwn) angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mittels T-Test für unverbundene Stichproben ermittelt. Experimente mit mehreren Gruppen wurden mittels ANOVA und anschliessendem Newman-Keuls Test analysiert. Statistische Signifikanz wurde für  $p < 0,05$  angenommen.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war die Aufklärung, der für die Phosphorylierung des Calretikulins relevanten Mechanismen. Hierzu werden verschiedene Hemmstoffe gegen deren Aktivierung verwendet. Die Stabilität der AT1-Rezeptor mRNA wurde mittels Northern Blot untersucht. Zur Überprüfung der gefundenen Daten dienten die Techniken der Immunpräzipitation aus transfizierten Zellen und Quantitativen PCR.

### 4.2 Hemmung von Kinasen und Phosphatasen und deren Wirkung auf die AT1-Rezeptor mRNA

Im Kern der Experimente stand die selektiven Hemmung von Kinasen und Phosphatasen, welche möglicherweise für eine Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung des Calretikulins, und somit für dessen Aktivierung verantwortlich gemacht werden. Mit  $10^{-6}$ M Angiotensin II stimulierte glatte Gefäßmuskelzellen (VSMC) zeigten eine signifikante Herabregulation des AT1-Rezeptors aufgrund der Destabilisierung der AT1-Rezeptor mRNA (*Nickenig und Murphy, 1994; Nickenig und Murphy, 1996*). Dieser Effekt ist 4h nach Inkubation mit AngII am stärksten ausgeprägt. Es konnte ebenfalls bereits nachgewiesen werden, dass allein phosphoryliertes Calretikulin an die AT1-Rezeptor mRNA bindet und deren Abbau zu initiieren vermag. Calretikulin bindet an der AT1-Rezeptor mRNA im Bereich der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR). Diese für die Stabilität wichtige Sequenz besteht aus 20 Nukleotiden am Ende der 3'-UTR (2175-2195) (5'-AAGUAAUUUUAAUUGUAAUGU-3'). Mittels Immunpräzipitation wurde die Phosphorylierung einzelner Aminosäurereste des Calretikulins analysiert. Überraschenderweise zeigte sich dabei nicht nur eine Phosphorylierung der Tyrosinreste, sondern auch eine gleichzeitige Dephosphorylierung der Serinreste des Calretikulins. Unklar bleibt zunächst jedoch, ob und in welchem Ausmaß diese Dephosphorylierung für die Bindung an die AT1-Rezeptor mRNA notwendig ist (Abb. 4.1.A und B)

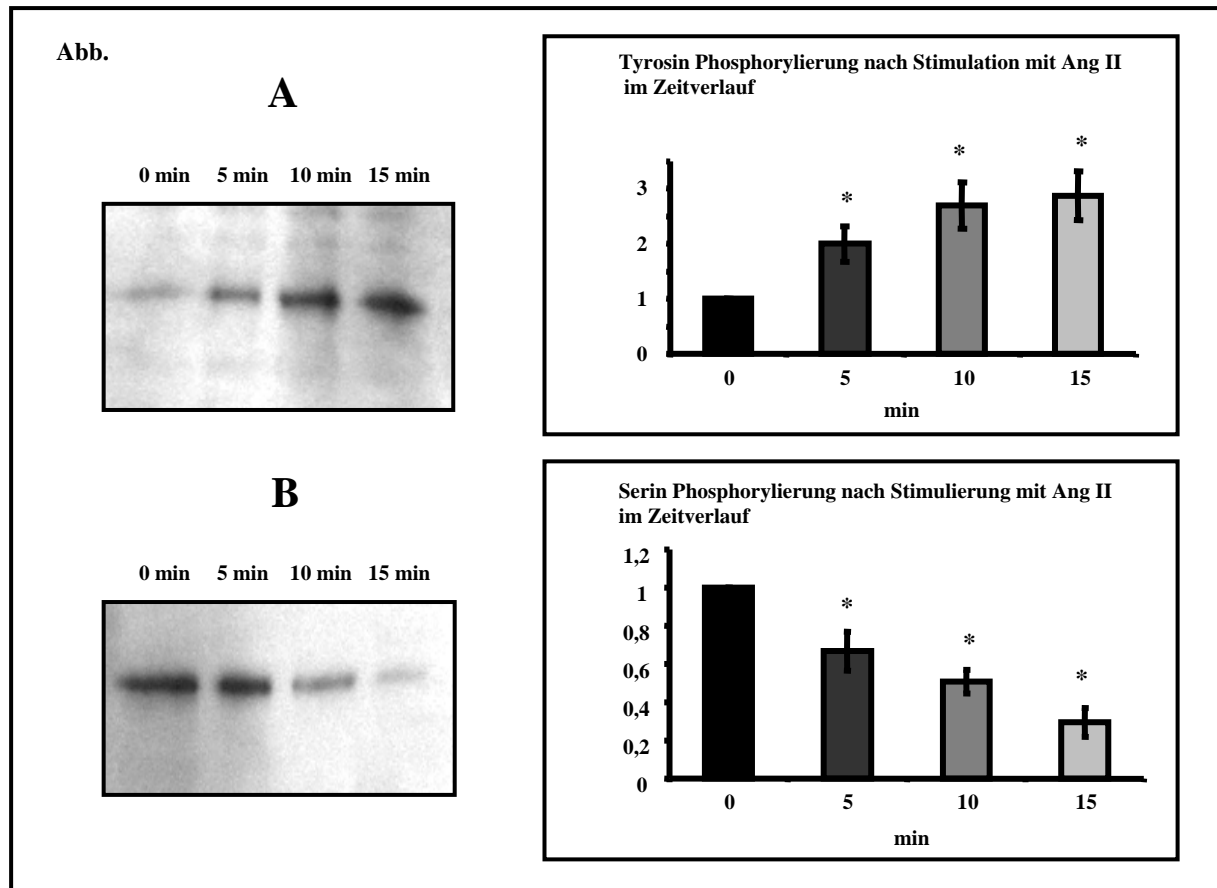


Abb.4.1: Es erfolgt eine Stimulation der VSMC für 5, 10 und 15 min mit Angiotensin II. Der Zeitpunkt 0 min entspricht der unstimulierten Kontrolle. Calretikulin wurde mittels Immunpräzipitation eluiert und mit Western Blot Technik analysiert. Zur Testung der Tyrosin bzw. Serin-Phosphorylierung von Calretikulin wurden verschiedene Antikörper verwendet. **A:** Stimulation mit Angiotensin II führte zu einer erhöhten Phosphorylierung der Tyrosinreste des Calretikulins. **B:** Stimulation mit Angiotensin II führte zu einer verminderten Phosphorylierung der Serinreste. n=5-9; p< 0,05

#### 4.2.1 Der Serin-Phosphatase-Hemmstoff Cantharidin

Um die Folgen einer Serin-Dephosphorylierung am Calretikulin in Bezug auf die AT1-Rezeptor mRNA Stabilität zu untersuchen, wurde der Serin-Phosphatase-Hemmstoff Cantharidin eingesetzt. Der Wirkmechanismus des Cantharidins ist in Abbildung 4.2 gezeigt.

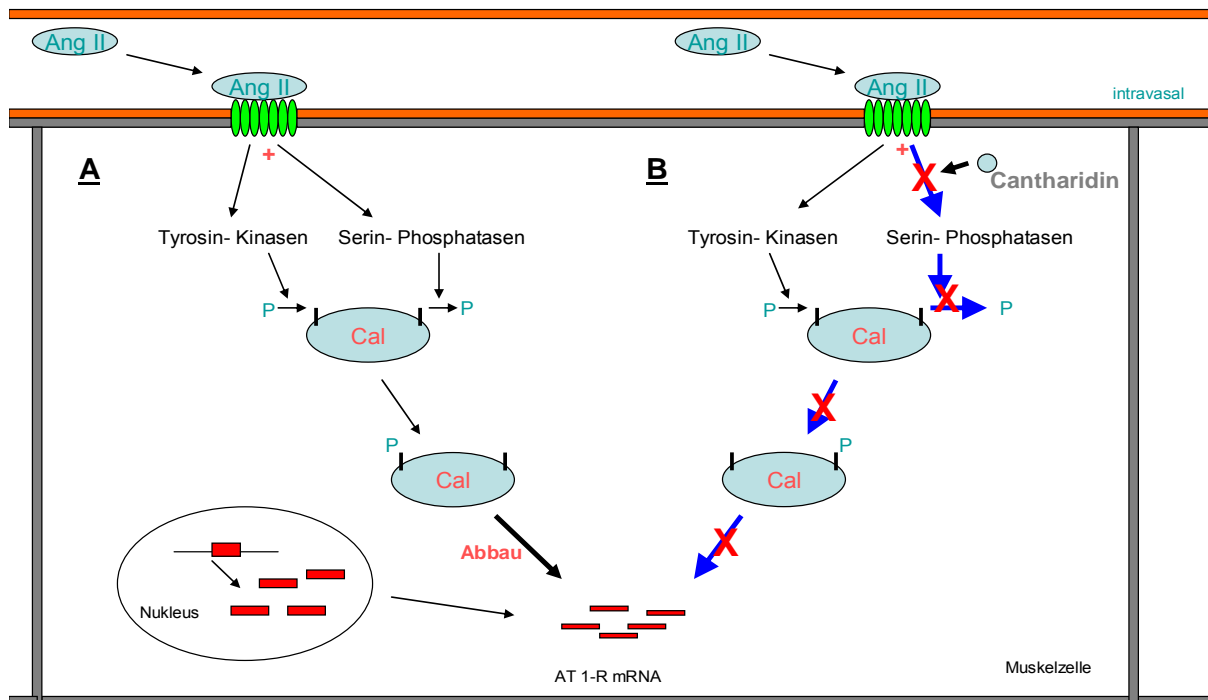


Abbildung 4.2: Nach Bindung von Angiotensin II an den AT1-Rezeptor kommt es über die Aktivierung von Kinasen/Phosphatasen zur Aktivierung des Calretikulins und als Folge zum Abbau der AT1-Rezeptor mRNA (A). Rechts in Schema B ist die hemmende Wirkung des Cantharidins auf Serinphosphatasen mit der vermuteten Unterbindung des AT1-Rezeptor mRNA Abbaus gezeigt.

Da pharmakologische Hemmstoffe häufig unspezifische Effekte vermitteln oder selbst als Agonisten wirken, wurde zuerst ein Zeitverlauf bezüglich der Wirkung des Cantharidins in Abwesenheit von Angiotensin II auf die AT1-Rezeptor mRNA Stabilität durchgeführt (Abbildung 4.3). Es zeigte sich eine tendentielle Zunahme der AT1-Rezeptor mRNA bis 1 h Einwirkdauer, die jedoch keine Signifikanz erreichte. Danach erfolgte eine signifikante Reduktion der Menge an AT1-Rezeptor mRNA.



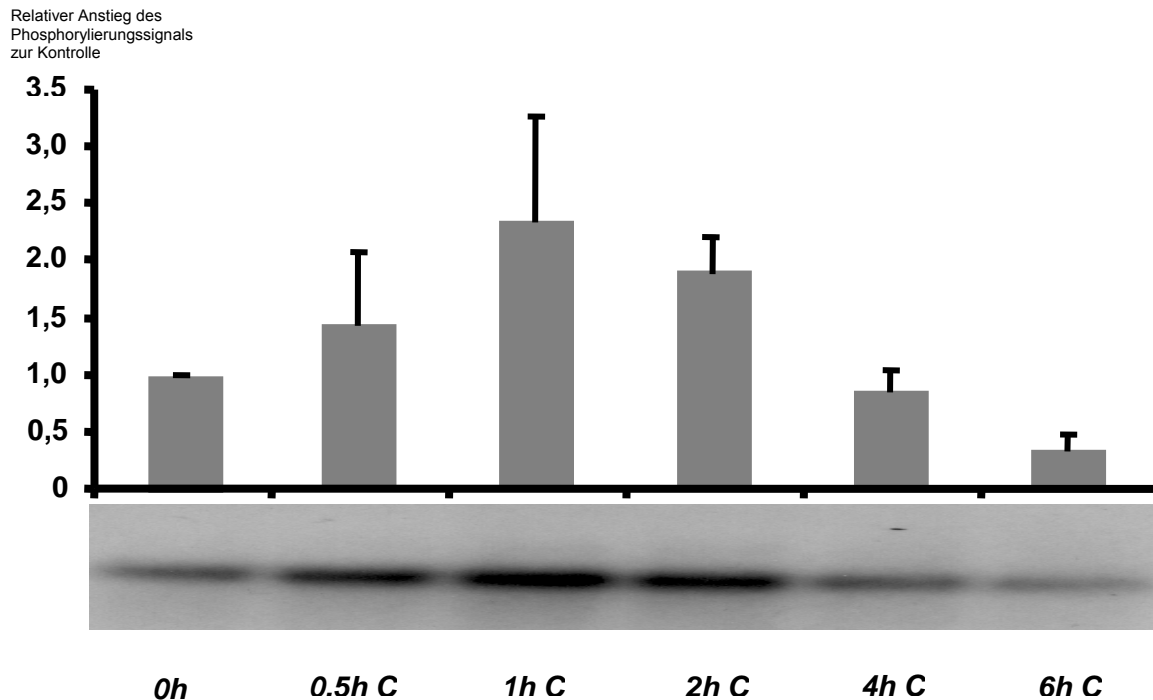


Abbildung 4.3: Dargestellt ist ein Northernblot von mRNA glatter Gefäßmuskelzellen mit einer radioaktiv markierten mRNA-Sonde vom AT1-Rezeptor. Untersucht wurde der Zeitverlauf nach Stimulation mit 2  $\mu$ M Cantharidin. Ergebnis: Es zeigte sich eine tendentielle Zunahme der Stabilisierung der AT1-Rezeptor mRNA nach einer Stunde, gefolgt von einer signifikanten Abnahme der mRNA-Menge  $n=3$ ,  $p<0,05$ , C=Cantharidin

Im Folgenden wurde mit gleicher Technik die AT1-Rezeptor mRNA Stabilität in Anwesenheit von Angiotensin II untersucht. Hierzu wurden VSMC mit 1  $\mu$ M Angiotensin II und 2  $\mu$ M Cantharidin stimuliert und über maximal 4h inkubiert. Die Hinzugabe von Cantharidin erfolgte jeweils 1h vor Zugabe von Angiotensin II. Eine Inkubationsdauer von 2 Stunden nach Angiotensin II Zugabe führte zu einer signifikanten Hochregulation der AT1-Rezeptor mRNA Menge. Dieser Effekt zeigte sich auch bei drei- und vierstündiger Inkubation, jedoch in abgeschwächter Form. Angiotensin II bewirkte ohne Cantharidinzugabe über alle getesteten Zeitabschnitte, wie zu erwarten, eine signifikante Herabregulation der AT1-R. mRNA. Eine pharmakologische Inhibition der Serindephosphorylierung führte somit zur Stabilisierung der AT1-Rezeptor mRNA. Dieses Ergebnis impliziert eine wichtige Rolle der Serindephosphorylierung des Calretikulins für die Regulation der AT1-Rezeptor mRNA.

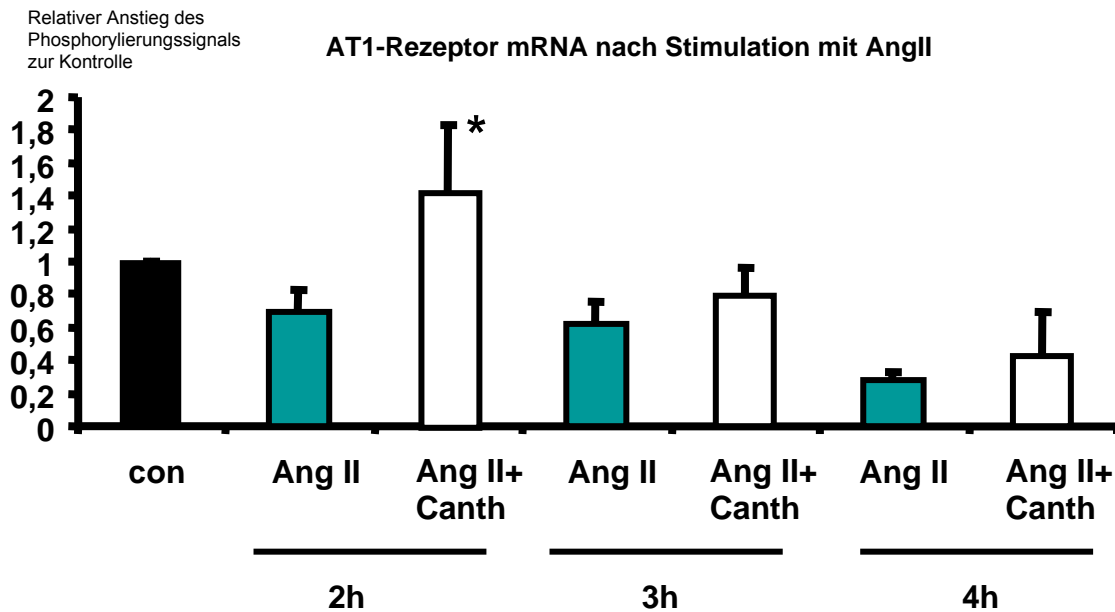


Abbildung 4.4: Dargestellt ist die summarische Auswertung mehrerer Northernblots von mRNA glatter Gefäßmuskulzellen mit einer radioaktiv markierten mRNA-Sonde vom AT1-Rezeptor. Die VSMC wurden für 1h mit 2µM Cantharidin vorinkubiert. Anschließend wurde für 2h, 3h und 4h noch 1 µM Angiotensin II hinzugegeben. Ergebnis: Es zeigte sich eine tendentielle Stabilisierung der AT1-Rezeptor mRNA. Eine signifikante Aufhebung des AngII Effektes wurde nach 2 h gesehen. n=3-4, p<0,05.

#### 4.2.2 Der Serin-Phosphatase-Hemmstoff Okadaic Acid

Die Effekte der Inhibierung der Serinphosphorylierung wurden mit einer zweiten Wirksubstanz bestätigt. Für diese Versuche wurde der Serin-Phosphatase-Hemmer Okadaic Acid (OA) benutzt. OA besitzt die Summenformel  $C_{44}H_{68}O_{13}$  und beeinflusst hauptsächlich Protein-Phosphatase 2A und 1. Dies führt zur Hemmung der Serinphosphatasen. Der Wirkmechanismus ist in Abbildung 4.5 dargestellt.

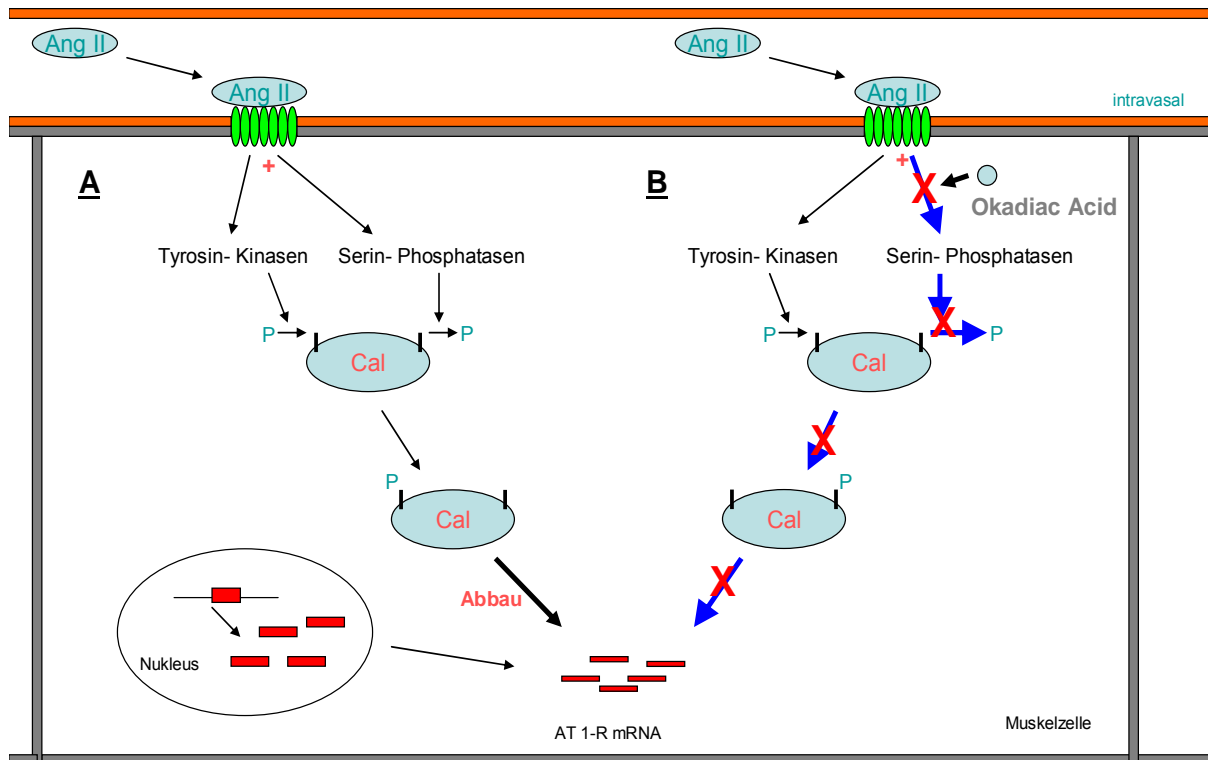


Abbildung 4.5: Nach Bindung von AngII an den AT1-Rezeptor kommt es über die Aktivierung von Kinasen/Phosphatasen zur Aktivierung des Calretikulins und als Folge zum Abbau der AT1-Rezeptor mRNA (A). Rechts in Schema B ist die hemmende Wirkung von Okadaic Acid auf Serinphosphatasen mit der vermuteten Unterbindung des AT1-Rezeptor mRNA Abbaus gezeigt.

Zur Quantifizierung der hemmenden Wirkung von Okadaic Acid auf Serin-Phosphatasen wurden entsprechend den Versuchen unter Verwendung von Cantharidin glatte Gefäßmuskelzellen der Ratte mit OA und Angiotensin II stimuliert. Es erfolgt die gleichzeitige Hinzugabe und gemeinsame Inkubation für vier Stunden. Für OA werden verschiedene Konzentrationen getestet. Die beobachteten Effekte unterschieden sich dabei nicht. Es zeigte sich eine tendentielle Zunahme der Stabilisierung der AT1-Rezeptor mRNA bei gleichzeitiger Stimulation von OA und 1  $\mu$ M Angiotensin II. (Abbildung 4.6).

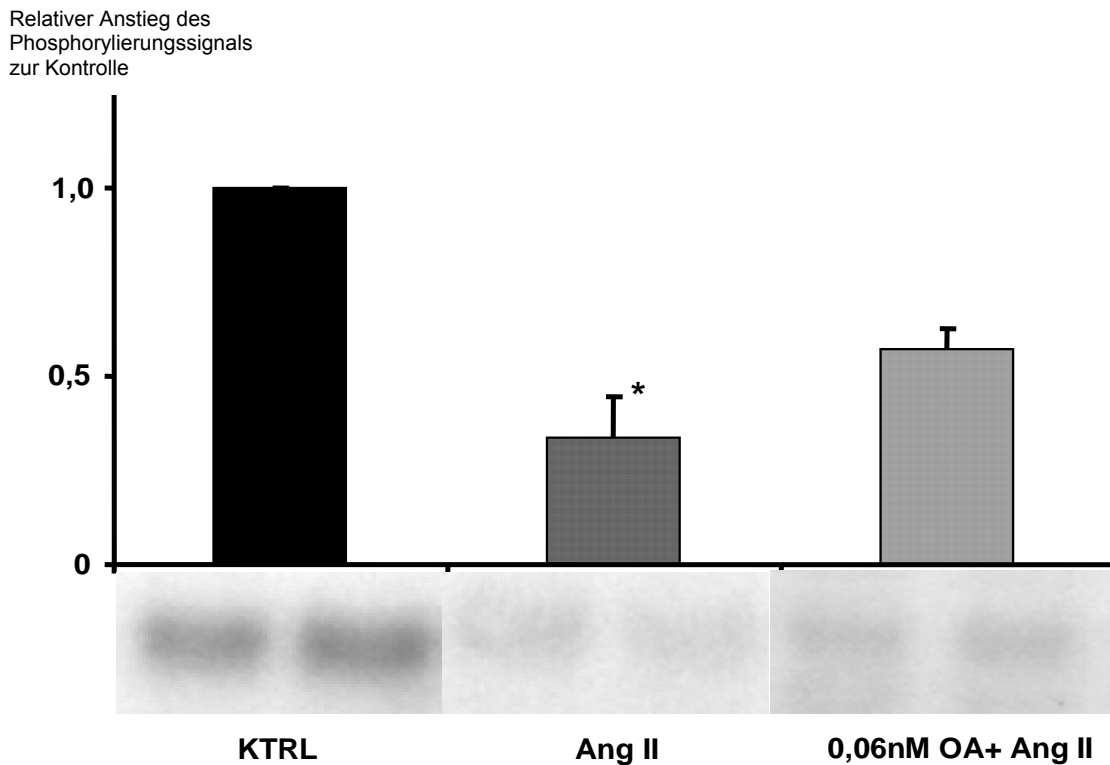


Abbildung 4.6: Dargestellt ist die summarische Auswertung mehrerer Northernblots von mRNA glatter Gefäßmuskelzellen mit einer radioaktiv markierten mRNA-Sonde vom AT1-Rezeptor. Es erfolgte die zeitgleiche Stimulation mit Okadiac Acid und Angiotensin II für 4h. Ergebnis: Tendenziell führte dies zur Stabilisierung der AT1-R. mRNA.  $n=2$ ,  $p<0,05$ , OA=Okadiac Acid.

Zusammengefasst zeigten die Versuche zur Hemmung von Serinphosphatasen unter Verwendung von Cantharidin und Okadiac Acid eine signifikante Stabilisierung der AT1-Rezeptor mRNA. Somit scheint eine Dephosphorylierung am Serinrest des Calretikulins für die Destabilisierung der AT1-Rezeptor mRNA wichtig zu sein.

### 3.2.3 Der Tyrosin-Kinase-Inhibitor Tyrphostin

#### Phosphorylierungsstellen von Calretikulin

Die Aminosäuresequenz des Calretikulins weist mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen auf:

XXX = Proteinkinase C Phosphorylierungsstelle

XXX = Tyrosinkinase Phosphorylierungsstelle

XXX = CK2 Phosphorylierungsstelle

XXX = N-Glycosylierungsstelle

Calreticulin Ratte(Proteinsequenz)

MLLSVPLLLGLLGLAAADPAIYFKEQFLDGDWNTNRWVESKHKSDFGKFVLSSGKFYGDQEKDKGLQ  
 TSQDARFYALSARFEPFSNKGQTLVVQFTVKHEQNIDCGGGYVKLFPGGLDQKDMHGDSEYNIMFG  
 PDICGPGTKKVHVIFNYKGKNVLINKDIRCKDDEFTHLYTLIVRPDNTYEVKIDNSQVESGSLEDDWDFL  
 PPKKIDPDAAKPEDWDERAKIDDPTDSKPEDWDKPEHIPDPDAKKPEDWDEEMDGEWEPPIQNP  
 EYKGEWKPRQIDNPDYKGTWIHPEIDNPEYSPDANIYAYDSFAVLGLDLWQVKSGTIFDNFLITNDEAY  
 AEEFGNETWGVTKAAEKQMKDKQDEEQRLKEEEEEDKKRKEEEEAEDEKEDDDRDEDEDEDEEKEE  
 DEEDATGQAKDEL

Abbildung 4.7: Phosphorylierungsstellen am Beispiel der Calretikulin-Proteinsequenz der Ratte

Die Phosphorylierung des Tyrosinrestes ist für die Regulation des AT1-Rezeptors entscheidend, denn ohne Phosphorylierung ist eine Bindung von Calretikulin an die AT1-Rezeptor mRNA nicht möglich. Der Tyrosin-Kinase-Hemmstoff Tyrphostin inhibiert hauptsächlich die EGFR (*epidermal growth factor receptor*)-Kinase. Eine Hemmung der SRC-Kinase ist ebenso beschrieben, welche jedoch nicht dem Ausmaß einer Inhibition von EGFR entspricht. Vorexperimente der Forschungsgruppe zeigen, dass die EGFR- und SRC-Kinase im Stande sind Calretikulin detektierbar zu phosphorylieren. Der Wirkmechanismus ist in Abbildung 4.8 dargestellt.

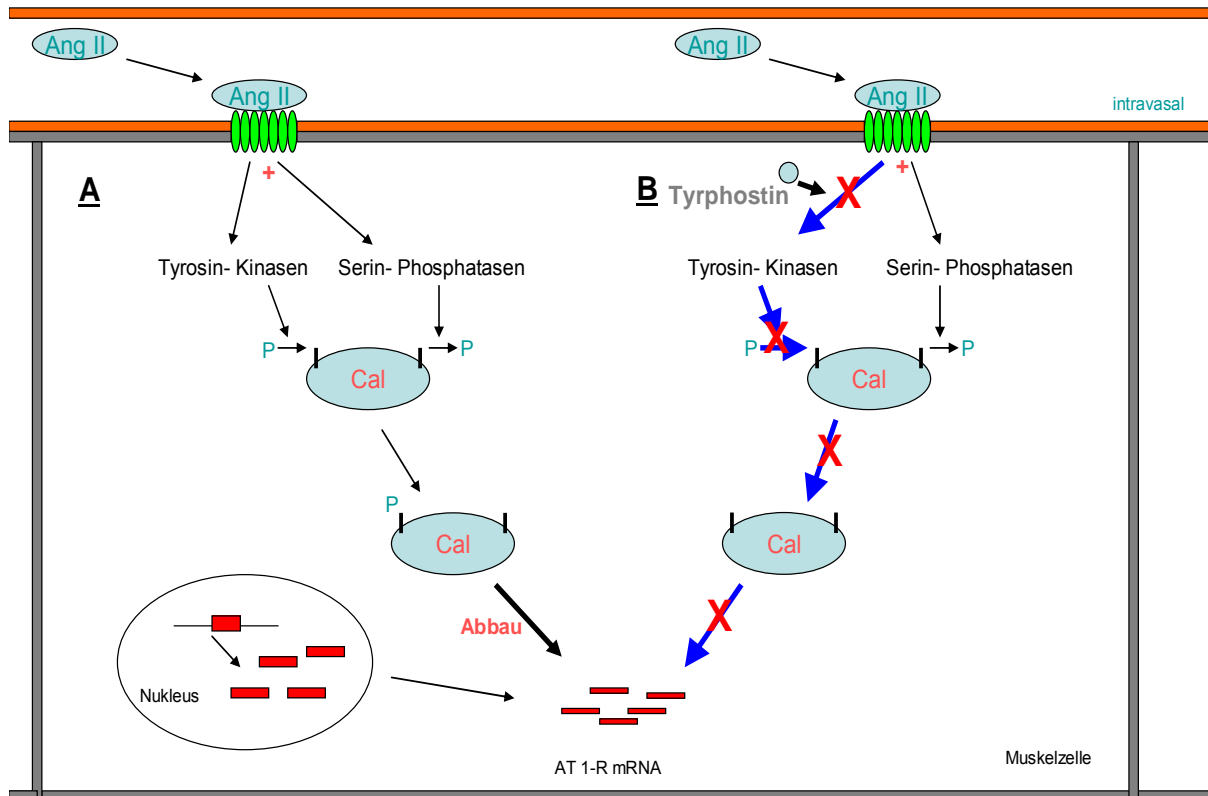


Abbildung 4.8: Nach Bindung von Angiotensin II an den AT1-Rezeptor kommt es über die Aktivierung von Kinasen/Phosphatasen zur Aktivierung des Calretikulins und als Folge zum Abbau der AT1-Rezeptor mRNA (A). Rechts in Schema B ist die hemmende Wirkung von Tyrphostin auf Tyrosinkinasen mit der vermuteten Unterbindung des AT1-Rezeptor mRNA Abbaus gezeigt.

Tyrphostin führt über die Hemmung der Tyrosin-Kinasen bei einer Konzentration von 5µM zu einer Stabilisierung der AT1-Rezeptor mRNA im Bezug auf die Angiotensin II stimulierte Kontrolle. Sowohl niedrigere als auch höhere Konzentrationen konnten dies nicht zeigen (*Abbildung 4.9*). Unter Einwirkung von Angiotensin II ohne Tyrphostin folgt die signifikanten Herabregulation der AT1-Rezeptor mRNA.

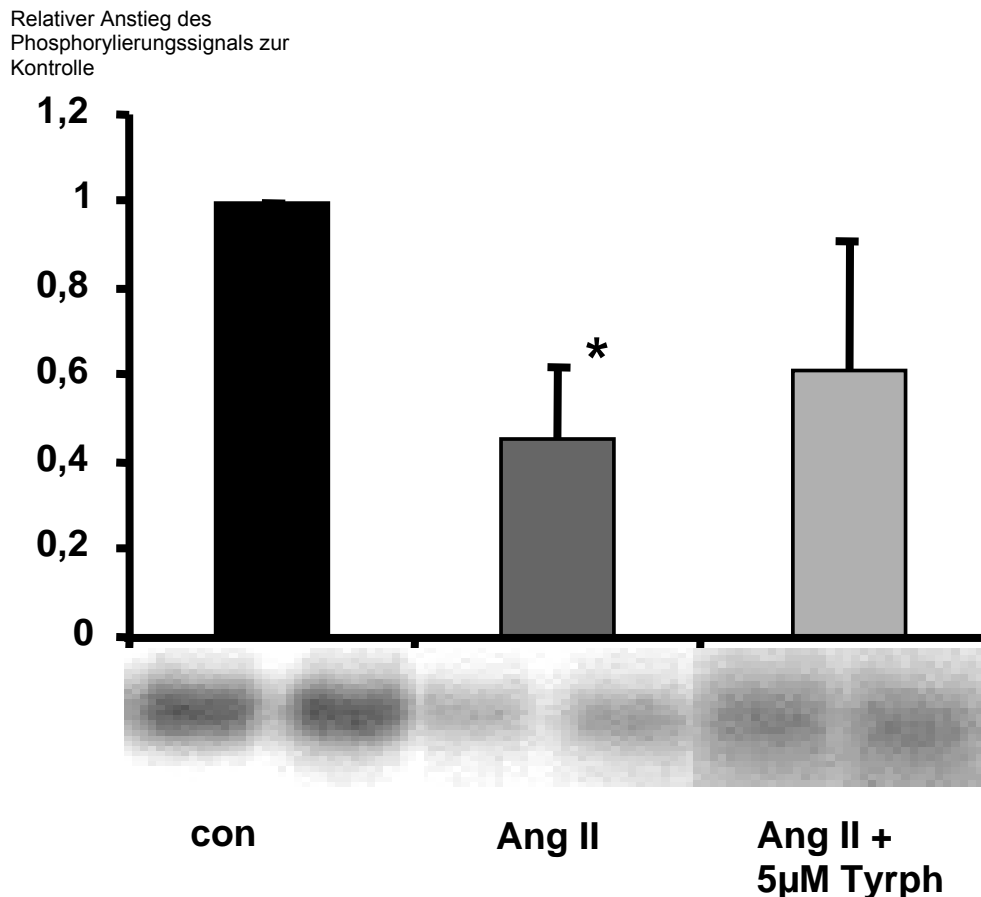


Abbildung 4.9: Dargestellt ist die summarische Auswertung mehrerer Northernblots von mRNA glatter Gefäßmuskelzellen mit einer radioaktiv markierten mRNA-Sonde vom AT1-Rezeptor. Es wurde mit Tyrphostin für 10 min vorinkubiert und anschließend mit Angiotensin II für 4h stimuliert. Ergebnis: Es zeigte sich eine tendentielle Stabilisierung der AT1-R. mRNA. n=9, p<0,05, Tyrph=Tyrphostin.

Eine Hemmung der Tyrosin-Kinasen mittels Tyrphostin führte zu einer signifikanten Stabilisierung der AT1-Rezeptor mRNA.

#### 4.2.4 Der Tyrosin- Phosphatase-Inhibitor Orthovanadat

Zur Bestätigung der unter 4.2.3 gezeigten Befunde wurde zusätzlich der auf Tyrosinphosphatasen wirkende Hemmstoff Orthovanadat eingesetzt. Orthovanadat ( $\text{VO}_4^{3-}$ ) ist ein Analogon des Phosphat-Ions. In Anwesenheit von ADP formt es einen stabilen Komplex mit Myosin, der durch Denaturierung von Myosin gelöst werden kann. Weiterhin ist Orthovanadat ein kompetitiver Inhibitor der alkalischen Phosphatase aus verschiedenen Organismen (Mensch, E.coli, u.a.). Ebenso ist für Orthovanadat eine aktivierende Wirkung auf Protein-Tyrosin-Kinasen beschrieben (Kim et al., 1999). Der Wirkmechanismus ist in Abbildung 4.10 dargestellt.

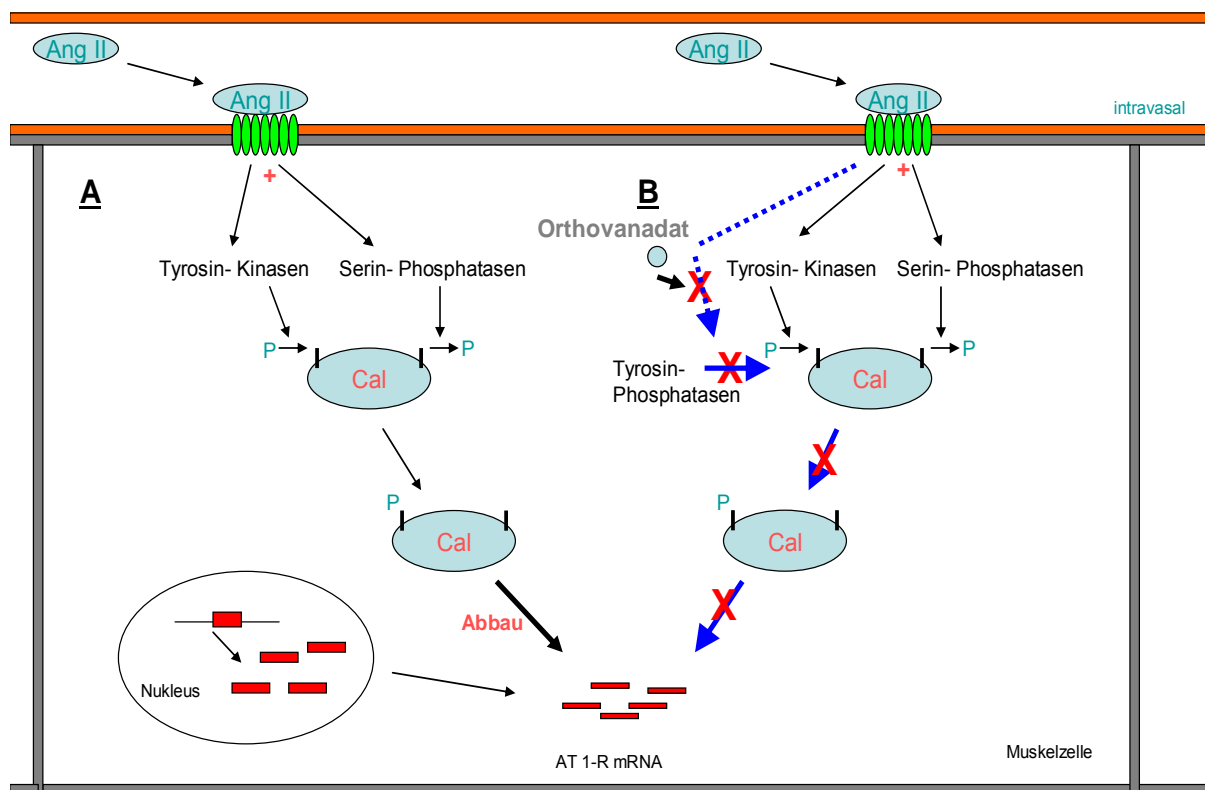


Abbildung 4.10: Nach Bindung von Angiotensin II an den AT1-Rezeptor kommt es über die Aktivierung von Kinasen/Phosphatasen zur Aktivierung des Calretikulins und als Folge zum Abbau der AT1-Rezeptor mRNA (A). Rechts in Schema B ist die hemmende Wirkung von Orthovanadat auf Tyrosinphosphatasen mit der vermuteten Unterbindung des AT1-Rezeptor mRNA Abbaus gezeigt.



Relativer Anstieg des  
Phosphorylierungssignals  
zur Kontrolle

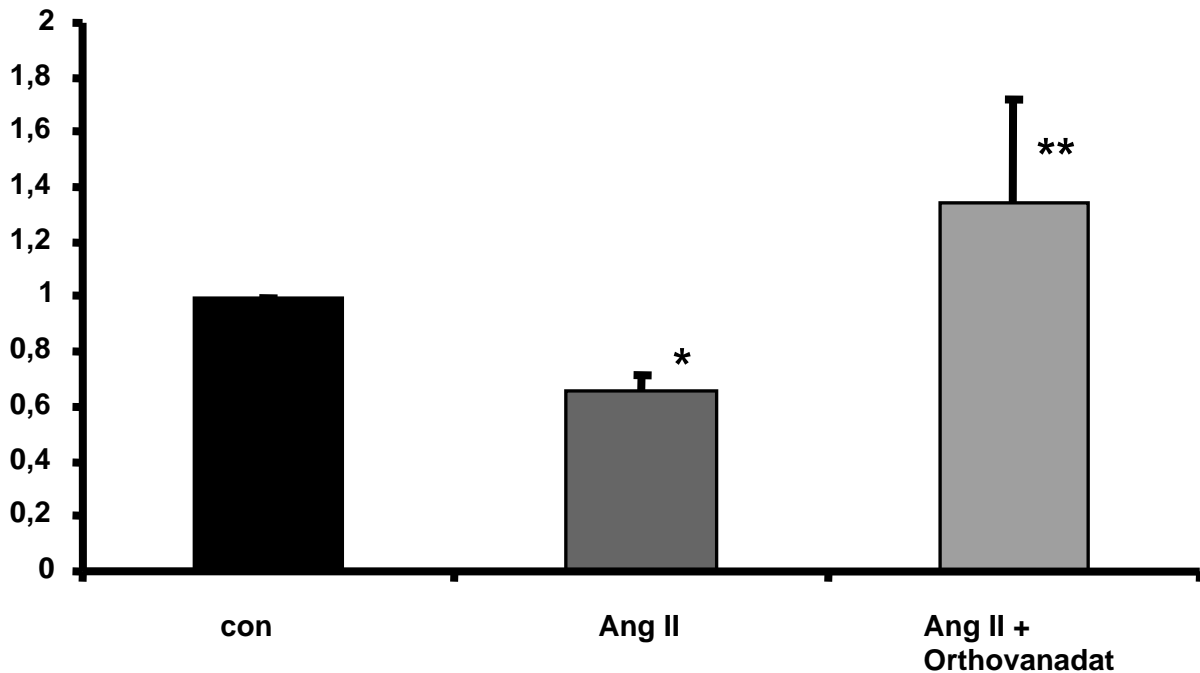


Abbildung 4.11: Dargestellt ist die summarische Auswertung mehrerer Northernblots von mRNA glatter Gefäßmuskelzellen mit einer radioaktiv markierten mRNA-Sonde vom AT1-Rezeptor. Es erfolgte die zeitgleiche Stimulation mit Orthovanadat und Angiotensin II für 4h. Ergebnis: Es zeigte sich eine signifikante Stabilisierung der AT1-Rezeptor mRNA. n=5, p<0,05.

Orthovanadat wird hierfür in der bereits etablierten Konzentration von 1mM eingesetzt. Bei zeitgleicher Stimulation von Orthovanadat und Angiotensin II zeigt sich eine signifikante Stabilisierung der AT1-Rezeptor mRNA im Vergleich zur AngII Kontrolle (*Abbildung 4.11*). Angiotensin II ohne Orthovanadat bewirkt im Vergleich zur Kontrolle eine signifikante Destabilisierung der AT1-Rezeptor mRNA.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass neben der Dephosphorylierung der Serinreste des Calretikulins auch der Phosphorylierung der Tyrosinreste eine entscheidende Bedeutung für die Bindung und Regulation der AT1-rezeptor mRNA zukommt.

## 4.3 Quantitative PCR

Die zuvor dargestellten Ergebnisse unter Verwendung von Tyrphostin zeigten eine wichtige Rolle der Tyrosinphosphorylierung für die Regulation der AT1-Rezeptor mRNA. Die Bedeutung der Tyrosin-Phosphorylierung wurde im Folgenden in Transfektionsexperimenten näher untersucht.

### 4.3.1 Die Tyrosin-Kinase SRC

Die SRC-Kinase wird in allen Zelllinien exprimiert. Es gehört zur Gruppe der sogenannten *nonreceptor* Tyrosin-Kinasen. Vorexperimente hatten gezeigt, dass eine Überexpression der SRC-Kinase die weitaus stärkere Phosphorylierung des Calretikulins bewirkte. Die Aktivität der SRC-Kinase wird über verschiedenste Rezeptoren, wie Rezeptor-Protein-Kinasen, Integrin Rezeptoren, G-Protein gekoppelte Rezeptoren, Antigen- und Fc-gekoppelte Rezeptoren, Zytokin Rezeptoren und Steroid Hormon Rezeptoren vermittelt (*Thomas et al., 1997*). Die Rolle des SRC-Kinase für Zelldifferenzierung, Proliferation, Zellmorphologie und Zellmotilität ist immens wichtig.

Um den Einfluss der SRC-Kinase auf die Stabilität der AT1-Rezeptor mRNA zu untersuchen, wurden SRCsense und antisense in den Vektor pcDNA3 cloniert und anschliessend in glatte Gefäßmuskelzellen transfiziert. Abbildung 4.12 zeigt für SRCsense transfizierte Zellen eine signifikante Erniedrigung der AT1-Rezeptor mRNA bezogen auf die ebenfalls unstimulierte insertfreie Vektorkontrolle. Stimulation mit Angiotensin II bewirkte keinen darüberhinausgehenden destabilisierenden Effekt.

Relativer Anstieg der  
Menge an AT1-Rezeptor  
mRNA zur Kontrolle

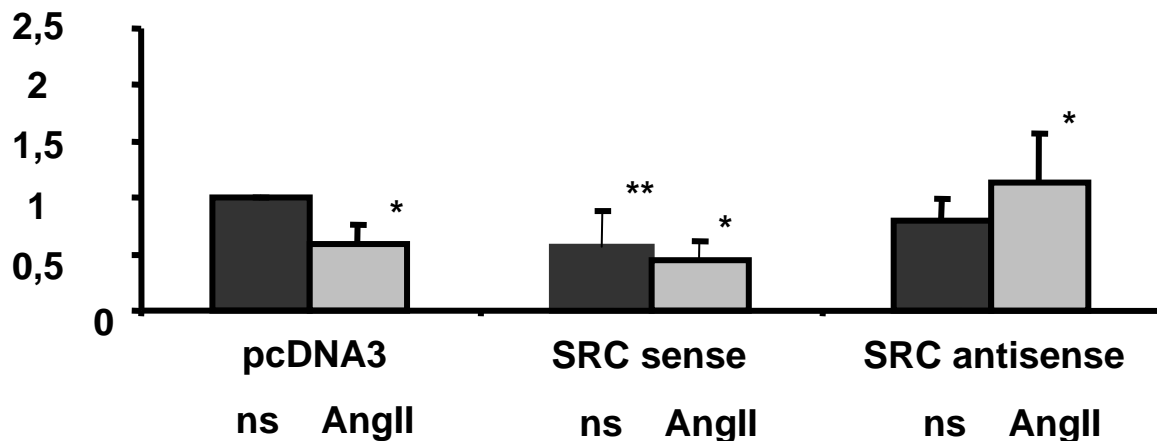


Abbildung 4.12: Transfektion von glatten Gefäßmuskelzellen durch pcDNA3 (*Kontrolle*) und pcDNA3/SRC sense/antisense. Zusätzlich wird jeweils mit Angiotensin II stimuliert. Gezeigt ist die Auswertung der quantitativen PCR von transfizierten Zellen. Ergebnis: SRCsense mit und ohne AngII führte zur signifikanten Herabregulation der AT1-Rezeptor mRNA im Vergleich zur unstimulierten insertfreien Vektorkontrolle. n=8-11, p<0,05.

Im Ergebnis zeigte sich durch die Experimente eine signifikante Destabilisierung der AT1-Rezeptor mRNA durch Überexpression der SRC-Kinase. Die Befunde bestätigten die wichtige Rolle der Phosphorylierung der Tyrosinreste des Calretikulins für die Regulation der AT1-Rezeptor mRNA.

#### 4.4 Immunpräzipitation aus transfizierten VSMC

Die in den bisherigen Experimenten erhobenen Daten wurden im Folgenden mit der Technik der Immunpräzipitation erhärtet. Überexpression der SRC-Kinase resultiert in einer Destabilisierung der AT1-Rezeptor mRNA. Zugleich sollte sich durch Transfektion von SRCsense eine verstärkte Phosphorylierung des Calretikulins nachweisen lassen. Um diese Theorie zu bestätigen, wurden VSMC mit SRCsense oder SRCantisense transfiziert. Abbildung 4.13 zeigt eine repräsentative Western-Analyse des geschilderten Experimentes.

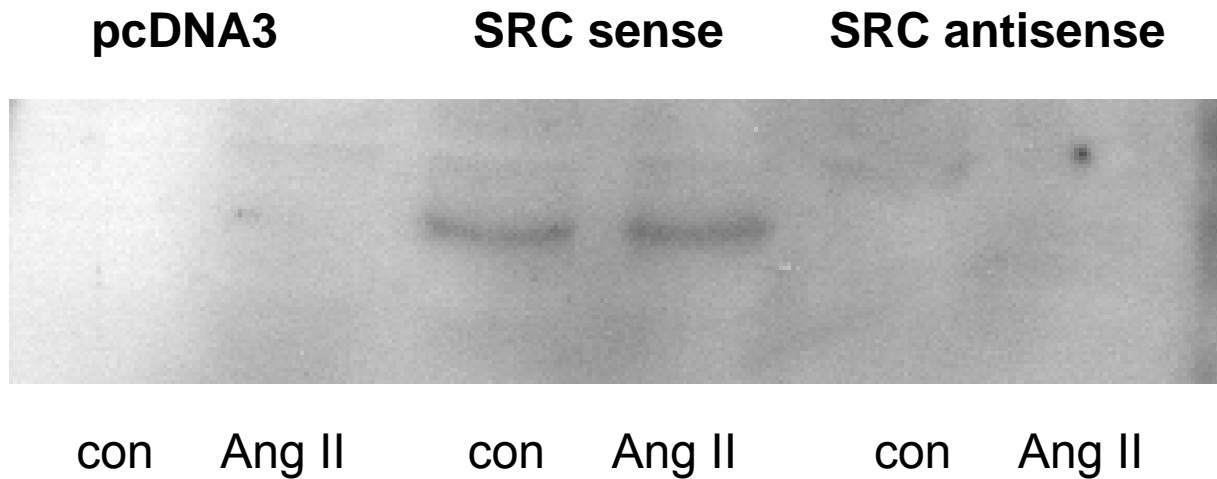


Abbildung 4.13: Transfektion von glatten Gefäßmuskelzellen mit insertfreien pcDNA3 (*Kontrolle*) und pcDNA3, das Fragment SRCsense bzw antisense enthaltend. Zusätzlich wird jeweils mit Angiotensin II stimuliert. Ergebnis: SRCsense führt zu einer deutlichen Zunahme der Phosphorylierung der Tyrosinreste am Calretikulin. Con=Kontrolle, unstimulierte VSMC; AngII=VSMC stimuliert mit Angiotensin II

## **5. Diskussion**

Im Zentrum der vorliegenden Arbeit stand die Untersuchung der Phosphorylierungsmechanismen des Calretikulins und ihr Einfluss auf die Stabilität der AT1-Rezeptor mRNA. Folgende Erkenntnisse konnten im Einzelnen gewonnen werden:

1. Stimulation mit Angiotensin II bewirkt an der Proteinstruktur von Calretikulin eine Phosphorylierung der Tyrosinreste sowie eine gleichzeitige Dephosphorylierung der Serinreste.
2. Sowohl Phosphorylierung der Tyrosinreste als auch Dephosphorylierung der Serinreste sind für die Funktion des Calretikulins notwendig.
3. Die Phosphorylierung der Tyrosinreste des Calretikulins erfolgt hauptsächlich durch die SRC-Kinase.
4. Überexpression der SRC-Kinase resultiert in einer Verminderung der Stabilität der AT1-Rezeptor mRNA sowie einer signifikant erhöhten Phosphorylierung des Calretikulins.

### **5.1 Bedeutung von Calretikulin für die Destabilisierung der AT1-Rezeptor mRNA**

Nach Bindung von Angiotensin II an den AT1-Rezeptor werden intrazellulär G-Proteingekoppelt verschiedene Signalwege in der Zelle initiiert. Es kommt unter anderem zu einer Phosphorylierung des Proteins Calretikulin. Calretikulin wurde initial als Calciumbindendes Protein beschrieben. Es besitzt darüber hinaus eine Vielzahl weiterer wichtiger Aufgaben. Hierunter ist insbesondere die Chaperon-Funktion des Calretikulins zu nennen. Chaperone sind wichtig für die Faltung und den Transport von Proteinen. Darüberhinaus wurde Calretikulin als mRNA Bindungsprotein beschrieben. Phosphoryliertes Calretikulin bindet an die AT1-Rezeptor mRNA in einem umschriebenen Abschnitt. Dieser für die Proteinbindung wichtige Bereich umfasst 20 Basen der Region 2175-2195: 5'-AAGUAAUUUUAUUGUAAUGU-3' (*Nickenig et al. 2001; Berger et al., 2005; Murphy et al. 1991*). In diesen *AU-rich elements* (AREs) am 3'-untranslatierten Ende der AT1-Rezeptor mRNA befindet sich eine Kopie des AUUUUA-Hexamers. mRNAs, die solche AREs besitzen, neigen zur Instabilität (*Peng*

et al. 1998). Es konnte bereits gezeigt werden, dass so genannte „stem loops“ über eine Deadenylierung des Poly A-Endes der 3'-UTR zu einer Destabilisierung der mRNA führen (Brown et al. 1996, Putland et al. 2002; Berger et al., 2005). Über die genauen Mechanismen des AT1-Rezeptor mRNA Abbaus ist derzeit noch wenig bekannt.

Calretikulin kann nur nach Phosphorylierung an die AT-Rezeptor mRNA binden. Der Prozess der Proteinphosphorylierung erfolgt durch verschiedene Enzyme, vor allem durch Kinasen und Phosphatasen. Ein wesentlicher Aspekt der Calretikulinphosphorylierung ist, dass diese differentiell erfolgt. Alleinige Phosphorylierung ist nicht ausreichend. Es kommt zu einer Phosphorylierung am Tyrosinrest des Calretikulins und zu einer Dephosphorylierung der Serinreste. Mittels UV-Crosslink-Assays wurde in weiteren Arbeiten die SRC-Kinase als wichtigstes Enzym der Phosphorylierung ermittelt. Vergleichbare differentielle Phosphorylierungsmechanismen wurden bislang nur für wenige Proteine gezeigt. Beispielsweise wird das *heterogenous nuclear riboprotein K*, gleichfalls ein mRNA Bindungsprotein, während der Embryogenese differentiell an Serin- und Threoninresiduen phosphoryliert (Iwasaki et al. 2006). In VSMC wurde bislang kein Protein beschrieben, das eine vergleichbare Modifizierung erfährt.

Die Phosphorylierung eines Proteins beeinflusst entscheidend seine Sekundär- und Tertiärstruktur. Möglicherweise bedingt die differentielle Phosphorylierung des Calretikulins eine Konformationsänderung des Proteins, die erst eine spezifische Bindung an die AT1-Rezeptor mRNA ermöglicht. Leider gibt es hierzu bislang keine weitergehenden Erkenntnisse. Diesbezügliche Untersuchungen sind technisch aufwändig und schwierig, da viele Methoden die Proteinelution gleichzeitig Konformation eines Proteins nachhaltig beeinflussen können.

## **5.2 Die Rolle der Phosphatasen für den Mechanismus des AT1-Rezeptor mRNA Abbaus durch Calretikulin**

Um die Wirkung der Phosphatasen auf das Calretikulins zu überprüfen, wurden die Serin-Phosphatase-Hemmstoffe Cantharidin und Okadaic Acid verwendet. Diese beiden Substanzen hemmen konzentrationsabhängig PP1 und PP2A. Hokanen (1993) wies eine Hemmung der PP1 bei  $IC_{50}$  von  $1,70 \pm 0,5 \mu M$  und der PP2A bei

0,16 $\pm$ 0,06  $\mu$ M von Cantharidin in PC12 Zellen nach. *Wera (et al., 1995)* beschrieb dies ebenfalls für hsp26 Zellen in vivo. In den oben dargestellten Ergebnissen zeigte eine Stimulation von VSMC mit 2 $\mu$ M Cantharidin eine Stabilisierung der AT1-Rezeptor mRNA nach 2h. Dieser Effekt verlor nach 4 und 8 Stunden seine Signifikanz bei gleichbleibender Tendenz der Stabilisierung. Warum die stabilisierende Wirkung von Cantharidin nach dieser Zeitspanne offenbar nachlässt, konnte nicht eruiert werden. Eine Vorstimulierung mit Cantharidin scheint wohl notwendig zu sein, damit Cantharidin optimal wirken kann.

Für die notwendige Konzentration der Okadaic Acids lassen sich unterschiedliche Angaben in der Literatur finden. Hierbei zeigte *Hokanen* eine IC<sub>50</sub> von 0,04nM für PP2A in PC12 Zellen, während *Wera (et al., 1995)* eine Hemmung von PP2A bei 0,2nM und von PP1 bei 20nM für hsp26 Zellen diskutierte. *Janssens (et al., 2001)* beschrieb eine Hemmung der PP2A bei 0,2 nM und der PP1 bei 2nM. Bei 0,06nM fand sich eine leichte Abschwächung der Angiotensin II vermittelten Destabilisierung der AT1-Rezeptor mRNA.

Aus den gezeigten Ergebnissen zur Serin-Dephosphorylierung lässt sich schließen, dass dieser Mechanismus entscheidend zur Destabilisierung der AT1-Rezeptor mRNA beiträgt.

### **5.3 Die Rolle der Kinasen für den Mechanismus des AT1-Rezeptor mRNA Abbaus durch Calretikulin**

Die durch Angiotensin II vermittelte Phosphorylierung des Calretikulins ermöglicht die Bindung des Proteins an die AT1-Rezeptor mRNA zwischen den Basen 2175-2195 und führt zum gesteigerten Abbau der mRNA. Hierbei stellte sich heraus, dass die SRC-Kinase zu einer detektierbaren Phosphorylierung führt, während  $\beta$ -IR-Kinase und Autophosphorylierung diesen Effekt nicht leisteten (*Nickenig et al., 2002b*). Eine Beteiligung von Wachstumsfaktoren, vor allem von EGF (*epidermal growth factor*), an der Destabilisierung der AT1-Rezeptor mRNA konnte ebenso nachgewiesen werden (*Nickenig et al., 1994*). Somit rückten SRC- und EGFR-Kinase ins nähere Interesse. Die Ergebnisse der Northern Blot Experimente mit dem Tyrosin-Kinase Hemmstoff Tyrphostin 47 zeigen bei einer Konzentration von 5 $\mu$ M eine signifikante Abschwächung des durch Angiotensin II vermittelten AT1-Rezeptor mRNA Abbaus. Die zur weiteren Untersuchung durchgeführte quantitative PCR bestätigte die Rolle

der SRC-Kinase sowie der Tyrosinphosphorylierung. Eine Überexpression von SRC sense in den VSMC führt bereits zu einer so starken Destabilisierung der AT1-Rezeptor mRNA, dass die zusätzliche Gabe von Angiotensin II keinen additiven Effekt bewirkt.

## **5.4 Klinische Bedeutung**

Herz-Kreislauferkrankungen gehören zu den häufigsten Todesursachen in den westlichen Industriestaaten. Artherosklerose ist gekennzeichnet durch Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen in Gefäßmedia und Intima. Diese Proliferation wird wesentlich durch den AT1-Rezeptor vermittelt (*Griendling et al., 1993*). Der Rezeptor wird posttranskriptionell in seiner Expression reguliert. Der wichtigste Agonist hierfür ist das Angiotensin II. Die gefundenen Mechanismen tragen zum genaueren Verständnis der Physiologie der AT1-Rezeptorregulation bei. Darüberhinaus lassen sich hierdurch neue Hypothesen zur Pathophysiologie generieren. Eine mögliche Ursache der arteriellen Hypertonie könnte beispielsweise in einer erhöhten Expression des AT1-Rezeptors liegen. Hierzu könnten Faktoren, wie ein verminderter Abbau der AT1-rezeptor mRNA etwa durch dysfunktionelle Phosphorylierungsloci des Calretikulin oder durch aktivitätsreduzierte Tyrosinkinasen entscheidend beitragen

## **4.5 Ausblick**

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen, dass neben der bereits bekannten Phosphorylierung des Calretikulins am Tyrosin auch die Dephosphorylierung am Serin eine erhebliche Rolle bezüglich der Aktivierung des Calretikulins einnimmt. Vermutlich ist eine Dephosphorylierung an einer anderen Tyrosinstelle die Voraussetzung für eine Konformationsänderung des Calretikulins, um eine Aktivierung des Calretikulins durch Serin-Dephosphorylierung und Tyrosin-Phosphorylierung zu ermöglichen. Eine Lokalisation der entsprechenden Tyrosin- und Serinstellen am Calretikulin könnte hierbei entscheidende Rückschlüsse geben. Zudem wäre die Identifikation weiterer Bindungsproteine (z.B. Endo- oder Exonucleasen) sinnvoll, die mit Calretikulin interagieren und Funktionen beim Abbau der AT1-Rezeptor mRNA übernehmen können. Ferner wäre zu untersuchen, wie und



über welche Proteinstrukturen Calretikulin Sekundärstrukturen der AT1-Rezeptor mRNA erkennen und binden kann. Das weitere Erforschen dieser Mechanismen ist zur Entwicklung medikamentöser Optionen für die Behandlung von kardialen Risikofaktoren oder möglicherweise sogar gentherapeutischer Ansätze bei Hochrisikopatienten zur Verminderung von Restenosen unabdingbar.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Atreya, C.D.; Singh, N.K.; Nakhasi, H.L. 1995. The rubella virus RNA binding activity of human calreticulin is localized to the N-terminal domain. *J. Virol.* 69 (6): 3848-51
2. Baksh, S.; Spamer, C.; Heilmann, C.; Michalak, M. 1995. Identification of the Zn<sup>2+</sup>-binding region of calreticulin. *FEBS Lett.* 376 (1-2): 53-7
3. Ben-Bassat, H.; Levitzki, A. 2000. Inhibitors of Tyrosin Kinases in the Treatment of Psoriasis. *IMAJ* 2: 69-73
4. Berger, A.; Stierkorb, E.; Nickenig, G. 2005. The role of the AUUUA hexamer for the posttranscriptional regulation of the AT1 receptor mRNA stability. *BBRC* 330 (2005): 805-812
5. Black, D.L. 1992. Activation of c-SRC neuron-specific splicing by an unusual RNA element in vivo and in vitro. *Cell.* 69: 795-807
6. Black, B.E.; Holaska, J.M.; Rastinejad, F.; Paschal, B.M. 2001. DNA binding domains in diverse nuclear receptors function as nuclear export signals. *Curr. Biol.* 11 (22): 1749-58
7. Bohjanen, P.R.; Petryniak, B.; June, C.H.; Thompson, C.B. and Lindsten, T. 1991. An inducible cytoplasmic factor (AU-B) bind selectively to AUUUA multimers in the 3'-untranslated region of lymphokine mRNA. *Mol. Cell. Biol.* 11: 3288-95
8. Brown, C.Y.; Lagnado, C.A.; Goodall, G.J. 1996. A cytokine mRNA-Destabilizing element that is structurally and functionally distinct from A+U-rich elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 13721-25
9. Burd, C.G. and Dreyfuss, G. 1994. Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science* 265: 615-21
10. Burns, K.; Duggan, B.; Etkinson, E.A.; Famulski, K.S.; Nemer, M.; Bleakley, R.C.; Michalak, M. 1994. Modulation of gene expression by calreticulin binding to the glucocorticoid receptor. *Nature* 367: 476-80
11. Capponi, A.M. 1996. Distribution and signal transduction of angiotensin II AT1 and AT2 receptors. *Blood Press Suppl.* 2: 41-6.
12. Chen, C.Y. and Shyu, A-B. 1995. AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem. Sci.* 20: 465-70
13. Cohen, P.; Cohen, P.T. 1989. Protein phosphatases come of age. *J. Biol Chem.* 264: 21435-21438

14. Cohen, P. 1994. The discovery of protein phosphatases: from chaos and confusion to an understanding of their role in cell regulation and human disease. *Bioessays* 16: 583-588
15. Coppelino, M.; Leung-Hagesteijn, C.; Dedhar, S.; Wilkins, J. 1995. Inducible interaction of integrin  $\alpha 2 \beta 1$  with calreticulin. Dependence on the activation state of the integrin. *Biol. Chem.* 270: 23132-38
16. Corbett, E.F.; Michalak, K.M.; Oikawa, K.; Johnson, S.; Campbell L.D.; Eggleton, P.; Kay, C. and Michalak M. 2000. The confirmation of calreticulin is influenced by the endoplasmic reticulum luminal environment. *J. Biol. Chem.* 275:27177-27185
17. Curnow, K.M. 1996. Human type-1 angiotensin II (AT1) receptor gene structure and function. *Clin Exp Pharmacol Suppl.* 3: 67-73
18. Darnell J. E. 1982. Variety in the level of gene control in eukaryotic cells. *Nature.* 297: 365-71
19. Dedhar, S. 1994. Novel functions for calreticulin: interaction with integrins and modulation of gene expression? *Trends Biochem. Sci.* 19: 269-71
20. DeFranco, D.B. 2001. Nuclear export: DNA-binding domains find a surprising partner. *Curr. Biol.* 11 (24): R 1036-7
21. Du, X-L.; Gao, Z.; Lau, C-P.; Chiu, S-W.; Tse, H-F.; Baumgarten, C.L.; Li, G-R. 2004. Differential Effects of Tyrosin Kinase Inhibitors on Volume-sensitive Chlorid Current in Human Atrial Myocytes: Evidence for Dual Regulation by SRC and EGFR Kinases. *J. Gen. Physiol.* 123: 427-439
22. Fadel, M.P.; Dziak, E.; Lo, C.M.; Ferrier, J.; Mesaali, N.; Opas, M. 1999. Calreticulin affects focal contact-dependent but not close contact-dependent cell-substratum adhesion. *J. Biol. Chem.* 274: 15085-94
23. Gray, A.J.; Park, P.W.; Broekelmann, T.J.; Laurent, G.J.; Reeves, T.J.; Stenmark, K.R.; Mecham, R.P. 1995. *J. Biol. Chem.* 270 (44): 26602-6
24. Green M.R. 1991. Biochemical mechanisms of constitute and regulated pre-mRNA splicing. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 7: 559-99
25. Griendling, K.K.; Murphy, T.J.; Alexander, R.W.; 1993. Molecular biology of the Renin-Angiotensin-System. *Circulation* 87(6): 1816-28
26. Griendling, K.K.; Lassegue, B.; Murphy, T.J and Alexander, R.W. 1994a. Angiotensin II-receptor pharmacology. *Advances in Pharmacol.* 28: 269-306
27. Griendling, K.K.; Minieri, C.A.; Ollerenshaw, J.D. and Alexander. 1994b. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured smooth muscle cells. *Circ. Res.* 74: 1141-1148
28. Groenendyk, J.; Michalak, M. 2005. Endoplasmic reticulum quality control and apoptosis. *Acta Biochim. Pol.* 52 (2): 381-95

29. Gunther, S. 1984. Characterization of angiotensin II receptor subtypes in rat liver. *J. Biol. Chem.* 259: 7622-7629
30. Guo, L.; Groenendykt, J.; Papp, S.; Dabrowska, M.; Knoblach, B.; Kay, C.; Robert Parker, J.M.; Opas, M. and Michalak M. 2003. Identification of an N-domain histidin essential for chaperone function of calreticulin. *J. Biol. Cell.* 278/50: 50645-50653
31. Herzig, S.; Neumann, J. 2000. Effect of Serin/Threonin Protein Phosphatases on Ion Channels in Excitable Membranes. *Physiol. Rev.* 80: 173-210
32. Højrup, P.; Roepstorff, P. and Houen, G. 2001. Human placental calreticulin. *Eur. J. Biochem.* 268: 2558-2565
33. Hoffmann, S.; Krause, T.; van Geel, P.P.; Willenbrock, R.; Pagel, I.; Pinto, Y.M.; Buikema, H.; van Gilst, W.H.; Lindschau, C.; Paul, M.; Inagami, T.; Ganten, D.; Urata, H. 2001. Overexpression of the human Angiotensin II type 1 receptor in the rat heart augments load induced cardiac hypertrophy. *J. Mol. Med.* 79: 601-608
34. Hokanen, R.E. 1993. Cantaridin, another natural toxin that inhibits the activity of serin/threonin phosphatases types 1 and 2A. *FEBS* 330 (3): 283-286
35. Holaska, J.M.; Black, B.E.; Love, D.C.; Hanover, J.A.; Leszyk, J.; Paschel B.M. 2001. Calreticulin is a receptor for nuclear export. *J. Cell. Biol.* 152 (1): 127-40
36. Inagami,T.; Iwai,N.; Sasaki,K.; Guo, D.F, Furuta, H.; Yamano, Y.; Bardhan, S.; Chaki, S.; Makito, N.;Badr, K. 1993. Angiotensin II receptors: cloning and regulation. *Arzneimittelforschung. Feb*; 43(2A): 226-228
37. Inagami, T.; Yamano,Y.; Guo, D.F.; Furuta, H.; Ohyama, K.; Kambayashi, Y; Bardhan, S.; Takahashi, K.; Ichiki, T. 1994. Angiotensin II receptors: cloning and expression. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 27 (8): 1733-8
38. Iwasaki, T.; Koretomo, Y.; Fukuda, T.; Paronetto, M.P.; Sette, C.; Fukami, Y.; Sato, K. 2008. Expression, phosphorylation, and mRNA-binding of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K in *Xenopus* oocytes, eggs, and early embryos. *Dev Growth Differ.* 50(1): 23-40
39. Janssens, V.; Goris, J. 2001. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serin/threonin phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem. J* 353: 417-439
40. Johnson, S.; Michalak, M.; Opas, M.; Eggleton, P. 2001. The ins and outs of calreticulin: from the ER lumen to the extracellular space. *Trends Cell. Biol.* 11: 122-129
41. Jones K.A. 1989. HIV trans-activation and transcriptional control mechanisms. *New Biol.* 1: 127-35

42. Kai, H.; Griendling, K.K.; Lassegue, B.; Ollerenshaw, J.D.; Runge, M.S.; Alexander, R.W. 1994. Agonist-induced phosphorylation of the vascular type 1 angiotensin II receptor. *Hypertension*. 24(4): 523-7
43. Kim, J-H.; Do, H-J.; Wang, W-H.; Machaty, Z.; Han, Y-M.; Day B.N.; Prather, R.S.; 1999. A tyrosine phosphatase inhibitor, sodium orthovanadat, causes parthenogenetic activation of pig oocytes via increase in protein tyrosin kinase activity. *Biology of Reproduction*. 61: 900-905
44. Kuwabara, K.; Pirskey, D.J.; Schmidt, A.M.; Benedict, C.; Brett, J.; Ogawa, S.; Broekman, M.J.; Marcus, A.J; Sciacca, R.; Michalak, M.et al. 1995. Calreticulin, an antithrombotic agent which binds to vitamin K<sup>+</sup>-dependent coagulation factors, stimulates endothelial nitric oxide production, and limits thromboses in canini coronary arteries.*J. Biol. Chem*. 270: 8179-8187
45. Lassegue, B.; Alexander, R.W.; Nickenig, G.; Clark, M.; Murphy, T.J. and Griendling, K.K. 1995. Angiotensin II downregulates the vascular smooth muscle AT1-receptor by transcriptional and posttranscriptional mechanisms: evidence for homologous and heterologous regulation. *Mol. Pharmacol*. 48: 601-609
46. Li, Y.M.; Casida, J.E. 1992. Cantharidin-binding protein: identification as protein phosphatase 2A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89(24): 11867-70
47. Liu, G.; Espinosa, E.; Luscher, T.F. 1995. Angiotensin stimulates migration of human vascular smooth muscle cells via AT1 receptors. *Eur. J. Clin. Invest*. 25 /Suppl. (2): 145-151
48. Liu, Q.; Fofmann, P.A. 2002. Antiadrenergic effects of adenosin A1 receptor-mediated protein phosphatase 2a activation in the heart. *J Physiol. Heart Circ. Physiol*. 283: H1314-H1321
49. Luchtefeld, M.; Drexler, H.; Schieffer, B. 2001. Role of G $\beta$ -Subunit in Angiotensin II-Type 1 Receptor Signaling. *BBRC* 280: 756-760
50. Malter, J.S. and Hong. 1991. A redox switch and phosphorylation are involved in the post-translational up-regulation of the adenosine-uridine binding factor by phorbol ester and ionophore. *J. Biol. Chem*. 266: 3167-71
51. Maquat L.E. 1991.Nuclear mRNA export. *Cirr. Opin. Cell Biol*. 3: 1004-1012
52. Marshall, C.J. 1995. Specificity of receptor tyrosin kinase signalling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*. 80: 179-185
53. Matsubara, H.; Shibasaki, Y.; Okigaki, M.; Mori, Y.; Masaki, H.; Kosaki, A.; Tsutsumi, Y.; Uchiyama, Y.; Fujiyama, S.; Nose, A.; Iba, O.; Tateishi, E.; Hasegawa, T.; Horiuchi, M.; Nahmias, C.; Iwasaka. 2001. Effect of Angiotensin II Type 2 Receptor on Tyrosin Kinase Pyk2 and c-Jun NH2-terminal Kinase via SHP-1 Tyrosin Phosphatase Activity: Evidence from Vascular-Targeted Transgenic Mice of AT2 Receptor. *BBRC* 282: 1085-1091

54. McCarthy, J.E.G and Kollmus, H. 1995. Cytoplasmatic mRNA-protein interactions in eukaryotic gene expression. *Trends Biochem. Sci.* 20 (5): 191
55. McCauliffe, D.P.; Yang, Y.S.; Wilson, J.; Sontheimer, R.D. and Capra, J.D. 1992. The 5'-flanking region of the human calreticulin gene shares homology with the human GRP78, GRp94, and protein disulfide isomerase promoters. *J. Biol. Chem.* 267:2557-2562)
56. McCluskey, A.; Sakoff, J.A. 2001. Small molecule inhibitors of serin/threonine protein phosphatases. *Mini Rev. Med. Chem.* 1 (1): 43-55
57. Michalak, M.; Corbett, E.; Mesaali, N.; Nakamura, M.; Opas, M. 1999. Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem. J.* 344: 281-292
58. Mitchell, A.; Rushentsova, U.; Siffert, W.; Philipp, T.; Wenzel, R.R. 2006. The Angiotensin II receptor antagonist valsartan inhibits endothelin 1-induced vasoconstriction I the skin microcirculation in humans in vivo: influence of the G-protein beta3 subunit (GNB3) C825T polymorhim. *Clin. Pharmacol. Ther.* 79 (3): 274-81
59. Müller, C.; Reddert, A.; Wassmann, S.; Strehlow, K.; Böhm, M.; Nickenig, G. 2000. Insulin-like growth factor induces upregulation of AT(1)-receptor gene expression in vascular smooth muscle cells. *J. Renin Angiotensin Aldosteron Syst.* 1 (3): 273-7
60. Murphy, T.J., Alexander, R.W.; Griendling, K.K.; Runge, M.S.; and Bernstein, K.E. 1991. Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature* 351: 233-236
61. Murphy, T.J.; Takeuchi, K. and Alexander, R.W. 1992. Molecular Cloning of AT1 angiotensin receptors. *Am. J. Hypertens.* 5: 236-242
62. Nakajima, M.; Hutchinson, H.G.; Fujinaga, M.; Hayashida, W.; Morishita, R.; Zhang, L. et al. 1995. The angiotensin II type 2 (AT<sub>2</sub>) receptor antagonizes the growth effects of the AT1 receptor: gain-of-funktion study using gene transfer. *Proc. Natl. Acad Sci, USA.* 92: 10663-10667
63. Nakamura, K.; Zuppini, A.; Arnaudeau, S.; Lynch, J.; Ahsan, I.; Krause, R.; Papp, S.; De Smedt, H.; Parys, J.; Müller-Esterl, W.; Lew, D.; Krause, K.; Demaurex, N.; Opas, M.; and Michalak, M. 2001. Functional specialization of calreticulin domains. *J. Cell. Biol.* 154/5: 961-972
64. Nakashima, H.; Suzuki, H.; Ohtsu, H.; Chao, J.Y.; Utsunomiya, H.; Frank, G.D.; Eguchi, S. 2006. Angiotensin II regulates vascular and endothelial dysfunction: recent topics of Angiotensin II type-1 receptor signalling in the vasculature. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 4 (1): 67-78
65. Nash, P.D.; Opas, M. and Michalak, M. 1994. Calreticulin: not just another calcium-binding protein. *Moll. Cell. Biochem.* 135: 71-8
66. Nickenig, G. and Murphy, T.J. 1994. Downregulation by growth factors of vascular smooth muscle angiotensin receptor gene expression. *Mol. Pharmacol.* 46: 653-659

67. Nickenig, G. and Murphy, T.J. 1996. Enhanced AT1-receptor mRNA degradation and induction of polyribosomal mRNA binding protein by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Mol. Pharmacol.* 50(4): 743-51
68. Nickenig, G.; Jung, O.; Strehlow, K.; Zolk, O.; Linz, W.; Schölkens, B.A. and Böhm, M. 1997a. Hypercholesterolemia is associated with enhanced angiotensin AT1 receptor expression. *Am. J. Physiol.* 272(6Pt2), H2701-2707
69. Nickenig, G.; Geisen, G.; Vetter, H.; Sachinidis, A. 1997b. Characterisation of angiotensin receptors on human skin fibroblasts. *J. Mol. Med.* 75 (3): 157-59
70. Nickenig, G.; Laufs, U.; Schnabel, P.; Knorr, A.; Paul, M. and Böhm, M. 1997c. Down-regulation of aortic and cardiac AT1 receptor gene expression in TG (mREN2)27 rats. *Br. J. Pharmacol.* 121(1): 134-40
71. Nickenig, G.; Baumer, A.T.; Grohe, C.; Kahlert, S.; Strehlow, K.; Rosenkranz, S.; Stablein, A.; Beckers, F.; Smits, J.F.; Daemen, M.J.; Vetter, H.; Böhm, M. 1998a. Estrogen modulates AT1 receptor gene expression in vitro and in vivo. *Circulation* 97: 2197-201
72. Nickenig, G.; Roeling, J.; Strehlow, K.; Schnabel, P.; Böhm, M. 1998b. Insulin induces upregulation of vascular AT1 receptor gene expression by posttranscriptional mechanisms. *Circulation* 98(22): 2453-60
73. Nickenig, G.; Michaelsen, F.; Müller, C.; Vogel, T.; Strehlow, K.; Böhm, M. 2001. Posttranscriptional regulation of the AT1 receptor mRNA: identification of the mRNA binding motif and functional characterization. *FASEB J.* 15: 1490-92
74. Nickenig, G.; Harrison, D.G. 2002a. The AT1-Type Angiotensin Receptor in Oxidative Stress and Arterogenesis, Part II: AT1 receptor regulation. *Circ.* 105: 530-6
75. Nickenig, G.; Michaelsen, F.; Müller, C.; Berger, A.; Vogel, T.; Sachinidis, A.; Vetter, H.; Böhm, M. 2002b. Destabilization of AT1 receptor mRNA by Calreticulin. *Circ. Res.* 90: 53-58
76. Opas, M.; Dziak, E.; Fliegel, L.; Michalak, M. 2001. Regulation of expression and intracellular distribution of calreticulin, a major calcium binding protein of nonmuscle cells. *J. Cell. Physiol.* 149 (1): 160-71
77. Orr, A.W.; Pallero, M.A.; Murphy-Ullrich, J.E. 2002. Thrombospondin stimulates focal adhesion disassembly through Gi- and phosphoinositide 3-kinase-dependent ERK activation. *J. Biol. Chem.* 277 (23): 20453-60
78. Peng, S.S.; Chen, C.Y.A.; Shyu, A.B. 1998. RNA stabilization by the AU-rich element binding protein, HuR, an ELVA protein. *The EMBO Journal* 17 (12): 3461-70

79. Port, J.D.; Huang, C.Y. and Malbon, C.C. 1992.  $\beta$ - Adrenergic agonist that down-regulates receptor mRNA up-regulate a Mr 35000 protein that selectively bind to  $\beta$ -adrenergic receptor mRNAs. *J. Biol. Chem.* 267: 24103-8
80. Putland, R.A.; Sassinis, T.A.; Harvey, J.S.; Diamond, P.; Coles, L.S.; Brown, C.Y.; Goodall, G.J. 2002. RNA Destabilization by Granulocyte Colony-Stimulation Factor Stem. Loop Destabilization elements involves a single stem loop that promotes deadenylation. *Mol. Cell Biol.* 22 (6): 664-73
81. Rajagopal, K.; Lefkowitz, R.J; Rockman, H.A. 2005. When 7 transmembrane receptors are not G protein-coupled receptors. *J. Clin. Invest.* 115: 2971-2974
82. Roskoski, R. 2004a. SRC protein-tyrosin kinase structure and regulation. *BBRC* 324: 1155-1164
83. Roskoski, R. 2004b. The Erb B/Her receptor protein kinases and cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 319 (1): 1-11
84. Sachs A.B. 1993. Messenger RNA degradation in eukaryotes. *Cell* 74(3): 413-21
85. Saito, Y.; Ihara, Y.; Leach, M.R.; Cohen-Doyle, M.F. and Williams, D.R. 1999. Calreticulin functions in vitro as a molecular chaperon for both glycosylated and non-glycosylated proteins. *KMBO J.* 18 (23): 6718-6729
86. Saito, Y.; Berk B.C. 2000. Transactivation: a Novel Signaling Pathway from Angiotensin II to Tyrosine Kinase Receptors. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 33: 3-7
87. Seddiki, N.; Nato, F.; Lafaye, P.; Amoura, Z.; Piette, J.C.; Mazie, J.C. 2001. Calreticulin, a potential cell surface receptor involved in cell penetration of anti-DNA antibodies. *J. Immunol.* 166 (10): 6423-9
88. Stoll, M.; Steckelings, U.M.; Paul, M.; Bottari, S.P.; Metzger, R.; Unger, T. 1995. The angiotensin AT<sub>2</sub> receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 651-657
89. Thomas, S.M.; Brugge, J.S. 1997. Cellular functions regulated by SRC family kinases. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13: 513-609
90. Timmermans, P.B.; Wong, P.; Chiu, A.T.; Herblin, W.F.; Benfield, P.; Carini, D.J.; et al. 1993. Angiotensin receptors and angiotensin receptor antagonists. *Pharmacol Rev.* 45: 205-225
91. Vakalopoulou, E.; Schaack, J.; Shenkt, T. 1991. A 32- kilodalton protein binds to AU-rich domains in the 3'untranslated regions of rapidly degraded mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* 11: 2255-64
92. Vassiliakos, A.; Michalak, M.; Lehrman, M.A.; Williams, D.B. 1998. Oligosaccheride binding characteristics of the molecular chaperones calnexin and calreticulin. *Biochemistry* 37: 3480-90



93. Waser, M.; Mesaeli, N.; Spencher, Ch. And Michalak, M. 1997. Regulation of calreticulin gene expression by calcium. *J. Cell. Biol.* 138/3: 547-557
94. Wera, S.; Hemmings, B.A. 1995. Serin/threonin protein phosphatases. *Biochem. J* 311: 17-29
95. Wheeler, D.G.; Horsford, J.; Michalak, M.; White, J.H.; Henry, G.N. 1995. Calreticulin inhibits vitamin D3 signal transduction. *Nucleic. Acids. Res.* 23 (16): 3268-74
96. Yamada, T.; Horiuchi, M.; Dzau, V.J. 1996. Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996: 150-160
97. Yang, S.G.; Saifeddine, M.; Laniyonu, A.; Hollenberg, M.D. 1993. Distinct signal transduction pathways for angiotensin-II in guinea pig gastric smooth muscle: differential blockade by indomethacin and tyrosin kinase inhibitors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 264 (2): 958-66
98. Yokoyama, N.; Miller, W.T. 2001. Protein phosphatase 2A interacts with the SRC kinase substrat. *Oncogene* 20: 6057-6065
99. You, Y.; Chen, C.Y.A and Shyu, A.B. 1992. U-rich sequence-binding proteins (URBPs) interacting with a 20-nucleotide U-rich sequence in the 3' untranslated region of c-fos mRNA may be involved in the first step of c-fos mRNA degradation. *Mol. Cell. Biol.* 12: 2931-40
100. Zhai, P.; Yamamoto, M.; Galeotti, J.; Liu, J.; Masurekar, M.; Thaisz, J.; Irie, K.; Holle, E.; Yu, X.; Kupersmidt, S.; Roden, D.M.; Wagner, T.; Yatani, A.; Vatner, D.E.; Vatner, S.F.; Sadoshima, J. 2005. Cardiac-specific overexpression of AT 1 receptor mutant lacking *Gaq/Gai* coupling causes hypertrophy and bradycardia in transgenic mice. *J. Clin. Invest.* 115 (11): 3045-3056.

## **7. Curriculum Vitae**

### **Persönliche Daten:**

Name	<u>Stefan</u> Michael Holz
Anschriften	Friedrich-Dannenmann Str 2, 72070 Tübingen Brunnenbacher-Weg 2, 82431 Kochel a. See
Geburtsdatum/-ort	26.02.1981 in Bad Tölz
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Konfession	römisch-katholisch

### **Schulausbildung:**

09/ 1987 - 07/ 1991	Grund- und Teilhauptschule Kochel a. See
08/ 1991 - 07/ 2000	Gabriel-von-Seidl-Gymnasium Bad Tölz
07/ 2000	Hochschulreife am Gabriel-v.-Seidl-Gymnasium Bad Tölz

### **Hochschulstudium:**

08/ 2001 - heute	Medizin-Studium an der Universität des Saarlandes
08/ 2003	Physikum
03/ 2004 - 06/ 2007	Experimentelle Doktorarbeit in der Kardiologie Homburg/Saar bei Professor Dr. G. Nickenig Thema: „Differentielle Phosphorylierung des Calretikulin beeinflusst die Stabilität der AT1-Rezeptor mRNA“.
11/2007	Staatsexamen und Approbation

### **Medizinische Tätigkeiten und Praktika:**

01/2008- heute	Assistenzarzt Anästhesie Uniklinikum Tübingen Leitung Universitätsprofessor Dr. K. Unertl
03/ 2007- 07/ 2007	Praktisches Jahr, Innere Medizin Uniklinikum Homburg/Saar Leitung Universitätsprofessoren Dr. M. Böhm/ Dr. H. Köhler

12/ 2006- 03/ 2007	Praktisches Jahr, Anästhesie Uniklinikum Homburg/Saar Leitung Universitätsprofessor Dr. R. Larsen
08/ 2006- 11/ 2006	Praktisches Jahr, Orthopädie Kantonsspital Luzern/Schweiz Leitung Dr. A. Staubli
02/ 2006- 03/ 2006	Famulatur Chirurgie BG Unfallklinikum Murnau Leitung Professor Dr. V. Bühren
09/ 2005- heute	Deutsche Unfallhilfe, Ausbilder EH für Berufsgenossenschaft
01/ 2005- heute	Deutsche Unfallhilfe, Ausbilder EH
11/ 2004- heute	Deutsche Unfallhilfe, Ausbilder LSM/SMU
09/ 2004- 10/ 2004	Famulatur Allgemeinmedizinpraxis Dr. Engelbrecht, Murnau
08/ 2004- 09/ 2004	Famulatur Kardiologie Uniklinik Homburg/Saar Leitung Universitätsprofessor Dr. M. Böhm
02/ 2004- 03/ 2004	Famulatur Innere Medizin Murnau Leitung Dr. J. Balssen
07/ 2002- 08/ 2001	SAN-Ausbilder Lehrgang Bergwacht, Brannenburg
07/ 2002- 08/ 2001	Pflegepraktikum KH Penzberg, Innere Medizin
08/ 2001- 09/ 2001	Praktikum Rettungssanitäter BG Unfallklinikum Murnau

**Ehrenämter:**

11/ 2007- heute	Bergwacht Kochel a. See, ärztlicher Berater
03/ 1997- heute	Bergwacht Kochel a. See, aktives Mitglied
02/ 2001- 03/2005	Bergwacht Kochel a. See, Leitender Ausbilder SAN A/B/C
02/ 2001- 03/2005	Bergwacht Kochel a. See, Mitglied der Bereitschaftsleitung
09/ 2001- heute	BRK Murnau, ehrenamtlicher Mitarbeiter auf NEF/NAW/RTW
10/ 2000- 08/2001	BRK Kochel a. See, Zivildienst

**Sprachkenntnisse:**

Englisch und Latein

Tübingen, 21.11.2008